

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia



TESI DI LAUREA

***VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DEL RUOLO DEI POLIMORFISMI DI eNOS NEL
PREDIRE LA TOSSICITA' E L'EFFICACIA DI UN TRATTAMENTO CON
BEVACIZUMAB IN PAZIENTI CON CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO***

RELATORE

Chiar.mo Prof. Alfredo Falcone

CANDIDATO

Cinzia Guerrini

Anno Accademico 2012-2013

INDICE DEI CONTENUTI

RIASSUNTO.....	3
1. INTRODUZIONE	
1.1 Epidemiologia del carcinoma della mammella.....	6
1.2 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 negativa.....	26
1.3 Bevacizumab nella terapia medica del tumore mammario.....	37
1.4 Tossicità indotta da bevacizumab.....	49
1.5 Ruolo dei polimorfismi genetici coinvolti nell'angiogenesi tumorale come biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità al bevacizumab.....	58
1.6 eNOS.....	65
1.7 RAZIONALE.....	70
1.8 OBIETTIVI.....	72
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Pazienti e disegno dello studio.....	73
2.2 Estrazione del DNA genomico.....	73
2.3 Amplificazione PCR del DNA genomico.....	74
2.4 Analisi dei polimorfismi con sequenziamento automatico.....	76
2.5 Real Time PCR – SNP genotyping.....	80
.	
3. RISULTATI	
3.1 Caratteristiche delle pazienti.....	85
3.2 Efficacia e tossicità dell'associazione di bevacizumab e taxani.....	87
3.3 Analisi delle varianti alleliche degli SNPs di eNOS.....	92
4. DISCUSSIONE.....	95
5. BIBLIOGRAFIA.....	99
6. APPENDICI.....	108

RIASSUNTO

Il tumore della mammella rappresenta la neoplasia più frequentemente diagnosticata e la maggiore causa di morte del sesso femminile a livello mondiale. Nel panorama della patologie oncologiche, il carcinoma della mammella viene considerato generalmente fra le neoplasie a prognosi favorevole. Nonostante ciò, il 5%-10% delle pazienti si presenta alla diagnosi ad uno stadio avanzato; in particolare il 10%-15% dei casi evolverà verso un quadro di disseminazione metastatica entro due anni, con una sopravvivenza mediana a cinque anni del 21%. Il trattamento del carcinoma della mammella metastatico si avvale di molteplici strategie terapeutiche rispetto al passato in quanto, fino a poco tempo fa, la malattia avanzata veniva considerata incurabile nella maggior parte dei casi e la scelta del clinico aveva, come obiettivo principale, la palliazione sintomatologica ed il contenimento della crescita neoplastica. Nonostante la chemioterapia rappresenti la pietra miliare nel trattamento di tale patologia, la loro elevata tossicità ed il frequente sviluppo di resistenza limita spesso l'utilizzo degli antitumorali. Con la crescente comprensione alla base della biologia delle patologie oncologiche, soprattutto in merito al processo di neoangiogenesi tumorale, nonché l'avvento di sofisticate tecniche genomiche e proteomiche, si è resa possibile l'identificazione di nuove terapie. In particolare, i farmaci inibenti il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), come Bevacizumab, assumono un ruolo chiave fra le opzioni terapeutiche, in associazione a taxani, come trattamento di prima linea nel setting metastatico del tumore della mammella. Questo trattamento, denominato targeted therapy, presenta una minore incidenza di eventi avversi rispetto ai regimi chemioterapici tradizionale; tuttavia, l'ipertensione arteriosa è il più comune effetto collaterale osservato nei pazienti che ricevono una terapia bevacizumab. Le ragioni di tale meccanismo risiedono nel ruolo fondamentale svolto da VEGF nell'angiogenesi tumorale, dove il letto vascolare neoformato è strutturalmente e funzionalmente anomalo, caratterizzato da irregolarità perfusionale ed elevati livelli di pressione interstiziale. VEGF può indurre la produzione di ossido nitrico (NO) agendo su eNOS (endothelial nitric oxide synthase, NOS3) grazie ad un processo di up-regulation; da qui si evince il ruolo fisiologicamente essenziale di quest'ultima sull'omeostasi della pressione sanguigna e sull'integrità vascolare per mezzo del rilascio costitutivo di NO a livello delle cellule endoteliali. La sovrapproduzione di ossido nitrico risultante sembra essere associata ad alterazione della barriera endoteliale ed alla formazione di edema,

inficiando dunque la capacità dell'agente antiangiogenetico di agire all'interno della formazione neoplastica. Recenti lavori hanno associato alcune varianti funzionali del gene eNOS, come i polimorfismi -786C>T ed 894G>T, ad una ridotta produzione di NO con conseguente aumentata incidenza di alterazioni dei valori pressori a livello ematico. Attualmente non è possibile disporre di biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità validati per quanto riguarda bevacizumab. Questo studio retrospettivo, il primo nel tumore della mammella in cui sono stati studiati i polimorfismi di eNOS -786C>T e 894G>T, come potenzialmente in grado di predire la risposta al trattamento con bevacizumab in termini di efficacia e tossicità, in particolare l'incidenza di ipertensione, nel tumore della mammella metastatico trattato con tale farmaco. In totale sono state arruolate 65 pazienti presso la U.O. di Oncologia Medica di Pisa. Le caratteristiche delle pazienti, tutte di sesso femminile ed HER2 negative, sono le seguenti: età mediana di 59 anni (range 29-73), performance status (ECOG PS) 0-1=61/4, recettori ormonali positivi/negativi=56/7, precedente chemioterapia adiuvante con taxani=12/65, pazienti sottoposte ad ormonoterapia adiuvante (40/65), età mediana diagnosi fase metastatica 43 anni (range 34-74), intervallo libero da malattia (DFI) mediano 39 mesi (range 0 – 22 anni), DFI < />12 mesi =17/48 12 mesi, numero mediano di sedi metastatiche < />3=26/39, con mediana= 3 (range 1-7), malattia viscerale/scheletro=52/3. Per quanto concerne il trattamento: pazienti che hanno ricevuto una chemioterapia di prima linea con paclitaxel in associazione a bevacizumab per una durata mediana di circa 6 mesi (range 2-24+), in seguito bevacizumab di mantenimento (48/65) per una durata mediana di circa 8 mesi (range 1-29+), pazienti che hanno eseguito una seconda linea di trattamento (30/65). In generale la mediana delle linee di trattamento utilizzate nelle pazienti analizzate risulta corrispondere a 2 (range 1-5). Il DNA germinale utilizzato è stato estratto da campioni di sangue periferico e l'analisi dei polimorfismi è stata eseguita con la metodica della real time PCR ed il sequenziamento automatico. Nell'ambito degli eventi avversi registrati, quello riscontrato con maggiore frequenza, è stato rappresentato dallo sviluppo di ipertensione arteriosa globalmente in 46 pazienti (71%), di grado 1-3 (secondo NTC-CTCAE), rispettivamente 20% per il grado 1, 43% per il grado 2 ed 8% per il grado 3. Il tasso di risposte oggettiva corrisponde al 59%; dopo follow-up mediano di 35 mesi (95% CI 21-50), il 71 % delle pazienti (46/65) risulta progredito mentre sono stati registrati 31 decessi (48 %). Globalmente la PFS mediana risulta essere di 14 mesi (95% CI 10-17), mentre la sopravvivenza globale mediana è di 39 mesi (95% CI 28-48). Le pazienti che

hanno proseguito bevacizumab di mantenimento ammontano al 74% (48/65), la PFS mediana di questo gruppo corrisponde a 14 mesi (95% CI 13-16) rispetto ai 3 mesi (95% CI 3-16; $p < 0.001$ log-Rank). Nei pazienti che hanno proseguito terapia di mantenimento con l'anticorpo monoclonale è stata evidenziata anche una migliore OS mediana di 42 mesi (95% CI 36-48) rispetto ai pazienti non sottoposti a tale trattamento per i quali è stata registrata una OS mediana di 15 mesi (95% CI 12-18). Dai risultati ottenuti è stato osservato che il genotipo -786TT, in comparazione con gli altri, è associato ad un beneficio in termini di PFS mediana (9 mesi dei genotipi CC/CT vs 12 mesi del genotipo TT; $p = 0.0066$; log-rank test). Anche i genotipi -894GT e TT sono risultati associati ad una più lunga PFS mediana rispetto al genotipo omozigote wild-type GG (10 mesi vs 7.5 mesi; $p = 0.0497$; Log-rank test). Per quanto riguarda l'incidenza e la severità dell'ipertensione, non sono state evidenziate associazioni significative. In conclusione, questa analisi retrospettiva, nonostante i risultati non ancora definitivi, suggerisce che, la casistica delle pazienti portatrici di mutazione allelica dei due polimorfismi esaminati, non presenta, per quanto riguarda il profilo della tossicità, un rischio aumentato di incidenza o severità ipertensiva ma, anzi, rispetto a quelle con genotipo wild-type, può beneficiare di un migliore outcome clinico in termini di PFS. La natura retrospettiva e l'assenza di un braccio di controllo, non permettono di trarre conclusioni definitive ed i risultati sono comunque da intendersi come del tutto preliminari. Abbiamo infatti intenzione di ampliare la casistica delle pazienti da esaminare e di aggiungere altri due polimorfismi oltre a quelli già in studio. Se i risultati ottenuti fossero in seguito confermati in modo prospettico, consentirebbero di identificare in maniera più accurata possibile i pazienti maggiormente responsivi ad un trattamento di prima linea con bevacizumab, permettendo un utilizzo più razionale delle risorse ed un approccio terapeutico personalizzato sul paziente.

1 INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia del carcinoma della mammella

Il tumore della mammella rappresenta la neoplasia più frequentemente diagnosticata e la maggiore causa di morte del sesso femminile a livello mondiale. Si calcola che il 23% (1.38 milioni) dei nuovi casi di neoplasie registrati nel 2008 e il 14% (458.400) dei decessi siano infatti dovuti a tale patologia. Circa la metà di questi e il 60% delle morti si verificano nei paesi in via di sviluppo.

In generale le zone a maggior incidenza sono costituiti: dall'Europa Nord Occidentale, Australia, Nuova Zelanda e Nord America mentre Minore frequenza si rileva in America del Sud, Caraibi e Nord Africa e le zone a bassa incidenza risultano essere l'Africa Subsahariana e l'Asia [[1]].

Ogni anno l'American Cancer Society (ASC) stima il numero di nuovi casi e di morti attese negli Stati Uniti per la patologia neoplastica globale. Per l'anno 2013 ha infatti indicato un totale di 1.660.290 nuove diagnosi, di cui 580.350 decessi attesi in tale periodo. Negli ultimi cinque anni è stata osservata una lenta diminuzione dell'incidenza globale per il sesso maschile (dello 0.6% annuo), ma nelle donne tale valore è rimasto stabile [2]

In particolare, analizzando i dati basati sui registri tumori di 187 paesi, il tumore della mammella ha subito un incremento rivelante dal 1980, con un'incidenza globale di 641.000 casi, al 2010, anno in cui tale valore è salito a 1.643.000, con un incremento annuo del 1%-3%. Il numero globale di decessi per tumore della mammella è stato di 425.000 casi, di cui 68.000 osservati nelle donne di età compresa fra i 15 ed i 49 anni residenti in paesi economicamente sviluppati [3].

Nel 2012 le tre neoplasie più comunemente diagnosticate fra le donne americane sono state infatti quella della mammella, insieme al tumore broncopolmonare e colon-rettale, costituendo il 29% dei nuovi casi. Nonostante il decremento della percentuale di decessi, grazie alla diagnosi precoce ed al miglioramento delle strategie terapeutiche, il tumore mammario si colloca al secondo posto come causa di morte per neoplasia fra le donne americane ed al primo in quelle di età compresa tra i 20 ed i 59 anni [4].

Nel 2003 è stato stimato, in base a 76 registri tumori europei, che in Europa viveva una donna su 73 con precedente storia di neoplasia mammaria [5].

In Italia si stima che nel 2013 verranno diagnosticati circa 48.000 nuovi casi di carcinomi della mammella, di cui solo il 2% si presenteranno nel sesso maschile. Non considerando i carcinomi cutanei, quello della mammella è la neoplasia a più elevata incidenza fra le donne residenti nel nostro paese: una neoplasia maligna ogni tre (29%) è costituita da un tumore della mammella. Il tasso di incidenza standardizzato per il sesso femminile è pari a 114/100.000/anno, mentre quello di mortalità standardizzato risulta di 24/100.000/anno. Il cancro della mammella risulta essere la neoplasia maggiormente diagnosticata nelle donne della fascia di età fra zero e 49 anni (41%), sia nella classe di età fra i 50 ed i 69 anni (35%), ma anche in quella comprendente le donne più anziane, dai settant'anni (21%).

Le differenze fra macro-aree osservate nel periodo 2006-2009 mostrano una maggiore incidenza al Nord (124.9/100.000 abitanti), rispetto al Centro (100.3/100.000) e al Sud-Isole (95.6/100.000). In Toscana sono state stimate, nel 2010, circa 4100 nuove diagnosi ed 850 decessi causati da questa patologia.

In linea con il trend internazionale, anche nel 2013, il carcinoma mammario costituirà la prima causa di morte femminile per tumore nel nostro paese con circa 12.500 decessi stimati, rappresentando il 28% delle cause di morte oncologica prima dei 50 anni, il 21% tra i 50 ed i 69 ed il 14% dopo i 70 anni [6]. L'esame dei tassi di incidenza per età, mostra come il tumore della mammella sia molto poco frequente nelle prime due decadi della vita, salendo a 100-200 casi/100.000 donne/anno per raggiungere il suo picco fra le ultrasessantenni con 300casi/100.000 donne/anno mantenendosi pressoché stabile nelle decadi successivii [7].

Tuttavia si è osservato globalmente un netto miglioramento della mortalità dovuto ad una combinazione di più fattori anche se molti esperti ritengono che il perfezionamento delle metodiche di screening e dei trattamenti siano le cause principali. Si stima che il solo utilizzo della mammografia avvenuto negli ultimi due decenni sia responsabile, dal 28% al 65%, della riduzione dei decessi. Secondo gli epidemiologi dell'American Cancer Society (ACS) si è registrato un decremento della mortalità del 31.3%, corrispondente a 75.000 donne americane salvate da morte per tumore della mammella. Se il numero di decessi continuerà a diminuire in maniera costante, la mortalità si ridurrà approssimativamente del 50% dal 2015 [8]. Il rischio, durante il corso della vita, di morire per carcinoma della mammella a partire dai 40 anni è del 3% ma, dai risultati di recenti studi randomizzati, tale valore ha subito un netto miglioramento. Grazie alla sola

esecuzione dell'esame mammografico biennale, la riduzione della mortalità fra le donne nel range di età compreso fra i 50 ed i 74 anni è stata stimata del 2.3% [9].

Nonostante ciò, una netta disparità relativa allo status socio-economico ed alle caratteristiche razziale, si ritrova fra le donne appartenenti alle fasce di popolazione meno abbienti. Come negli Stati Uniti che dagli anni '90 è stata registrata una diminuzione globale di mortalità per tumore della mammella, ad eccezione delle indiane native americane o dell'Alaska, presso le quali la percentuale è rimasta stabile. Il decremento della mortalità è avvenuto infatti tardivamente fra le donne residenti nelle aree più povere. Tale discrepanza si evince anche dalle percentuali relative all'anno 2008, secondo le quali il 51.4% delle donne residenti nelle zone economicamente svantaggiate degli Stati Uniti si è sottoposta all'esame mammografico di screening nei precedenti due anni, contro il 72.8% di quelle appartenenti alle zone più agiate [10].

A livello mondiale tali divergenze si riscontrano comparando i dati dei vari continenti, evidenziando diversità relative non solo alla differente collocazione geografica. Nel 2008, in Africa Occidentale, sono stati diagnosticati circa 30.000 casi di tumore della mammella e circa 16.000 decessi. In Europa Occidentale l'incidenza è stata cinque volte più alta con circa 40.000 morti. La diagnosi di tale patologia nelle donne europee avviene prevalentemente nella post-menopausa. Mentre nelle donne africane i due terzi dei nuovi casi si rilevano nel periodo antecedente alla menopausa, con un'età media di 48 anni. A causa della difficoltà di accesso alle strutture sanitarie e della mancanza delle campagne di prevenzione primaria, il 70% delle diagnosi in Africa viene fatta quando la patologia è ormai progredita ad uno stadio avanzato [11]. Fra le donne americane di origine afro-americana l'incidenza del tumore della mammella è inferiore rispetto a quelle di razza caucasica, anche se nei paesi africani, come la Nigeria, tale patologia non è infrequente. La percentuale di decessi risulta inoltre elevata, probabilmente a causa del differente assetto genetico relativo ai vari gruppi razziali [12].

In America Latina, l'incidenza di tumore della mammella si aggira intorno alle 114.900 nuove diagnosi l'anno, che si stima raddoppieranno nel 2030. In proporzione a tale valore, l'alto numero di decessi (37.000) risiede nel fatto che il 30%-40% dei casi presenta già metastasi a distanza [13].

In Thailandia la maggior parte delle diagnosi avviene nel momento in cui la neoplasia della mammella ha infiltrato la membrana basale. Le diagnosi di carcinoma duttale

infiltrante costituiscono infatti la maggioranza della casistica (84.2%), di cui il 36.4% presenta anche interessamento linfonodale loco-regionale [14].

La frequenza di tale patologia risulta in aumento in paesi considerati tendenzialmente a basso rischio negli anni precedenti. Dal 1990 è stato stimato un aumento complessivo del tumore della mammella dello 0.5% annuo. In particolare i registri dei tumori cinesi hanno evidenziato un aumento dal 3% al 4% annuo di tale patologia ed in Asia orientale un aumento del 3%.

La prognosi del tumore della mammella rimane generalmente piuttosto buona, con una percentuale di sopravvivenza stimata del 73% nei paesi industrializzati e del 57% in quelli in via di sviluppo. Le zone del Pacifico (Micronesia/Polinesia) hanno, ad esempio, un tasso di mortalità di poco superiore rispetto a quello rilevato in Europa [15].

In uno studio condotto a livello mondiale (CONCORD), sono stati confrontati 20.000 casi di tumori della mammella diagnosticati fra il 1996 ed il 1998, in donne di età compresa fra i 15 ed i 99 anni, residenti negli Stati Uniti e nei dodici paesi europei. In base ai dati rilevati, si è visto che i casi allo stadio iniziale e senza coinvolgimento linfonodale, erano localizzati prevalentemente negli Stati Uniti (39%) rispetto a quelli europei (32%), mentre sia i tumori localmente avanzati (8%), che quelli con diffusione metastatica (5%-6%), avevano una frequenza doppia nel vecchio continente. Nello stesso tempo la sopravvivenza delle donne residenti in Europa settentrionale, meridionale ed occidentale (81%-84%), era simile a quella delle americane (84%): questi valori diminuivano considerevolmente (69%), considerando i casi diagnosticati in Europa orientale [16]. Infatti, dopo diversi decenni di continuo incremento, i dati epidemiologici mostrano, a partire dagli anni '90, una riduzione in termini di mortalità in tutti i paesi dell'Europa occidentale. La fase discendente è iniziata prima nella zona settentrionale (già negli anni '80), successivamente, verso la fine di tale decennio, nell'Europa Sud-Occidentale, solo recentemente e parzialmente nell'Europa dell'Est [17].

Il livello e l'andamento della mortalità per cancro della mammella in Italia è simile a quello dei paesi limitrofi, soprattutto Francia e Germania. Caratteristica peculiare del nostro paese rispetto agli altri paesi europei, è la notevole variabilità geografica fra le diverse zone della penisola, in particolare fra Centro-Nord e zone meridionali. Tra i fattori che influenzano le differenze in termini di mortalità per tale patologia va considerata la copertura dei programmi di screening mammografico, avviati su base regionale in tempi diversi, che risulta essere notevolmente inferiore nelle regioni meridionali rispetto alla

media nazionale, permettendo una modesta ma costante diminuzione dei tassi di mortalità per tumore nella mammella (- 1,6%/anno), almeno in alcune fasce di età[18] [6]. L'attività di prevenzione primaria è iniziata in Italia a partire dagli anni '90. Inizialmente era limitata ad alcune zone, soprattutto il Piemonte e la Toscana, coinvolgendo una percentuale limitata di popolazione bersaglio (<5%). A partire dalla seconda metà dello stesso decennio, grazie al coinvolgimento di un numero maggiore di regioni interessate, era arrivata ad interessare il 15% della popolazione femminile di età compresa fra i 50 ed i 69 anni [19]. Il 2007 rappresenta l'anno in cui tutte le regioni italiane hanno attivato un programma di screening mammografico sul proprio territorio e se l'estensione teorica raggiunge il 91,7% quella effettiva vede tale valore diminuire al 69,1%, con grandi differenze fra le diverse aree geografiche. Nel 2010, circa 2.946.000 donne di età compresa fra i 50 ed i 69 anni, sono state invitate a sottoporsi alla mammografia biennale prevista in base alle campagne di prevenzione primaria della propria regione anche se esaminate solo 1.382.000. Il tasso di partecipazione medio italiano, che è rimasto sostanzialmente stabile nel tempo, ammonta al 55% notando anche in questo caso considerevoli differenze fra le regioni centro-settentrionali e quelle meridionali dove la percentuale scende al di sotto dello standard accettabile (<50%) [20].

I fattori di rischio della neoplasia mammaria costituiscono un gruppo eterogeneo e divisibile fra quelli non modificabili e quelli modificabili. I primi sono rappresentati dall'età (l'incidenza di tale patologia è infatti bassa prima dei trent'anni per poi aumentare fino agli ottanta), il menarca precoce (che prevede un aumento del rischio di sviluppare tale patologia dal 10% al 24% per ogni anno in cui viene anticipato), la menopausa tardiva (la perdita della funzione ovarica in età più avanzata comporta un aumento del rischio del 3% annuo). Tali considerazioni si basano sull'ipotesi che l'esposizione ormonale prolungata durante il periodo premenopausale, comporti un'alterazione dell'attività mitotica mammaria con conseguente aumento del rischio di oncogenesi a tale livello [21]. Altri fattori di rilievo sono la densità della mammella (le donne che all'immagine radiografica presentano una densità mammaria maggiore del 75% hanno un rischio quintuplicato) e la precedente storia di diagnosi di neoplasie mammarie benigne (in particolare la displasia atipica). Infine si deve considerare l'anamnesi familiare positiva per tumore della mammella (in particolare le donne con 0, 1 o 2 parenti di primo grado affette hanno un rischio di sviluppare tale patologia nel corso della vita rispettivamente del 7.8%, 13.3% e 21.1%) [22]. Secondo uno studio caso-controllo condotto in 13 centri

fra Italia e Svezia, nel quale sono stati valutati 12.000 casi e 11.000 controlli, la familiarità per neoplasia della mammella all'interno dello stesso nucleo familiare è tanto maggiore quanto più precocemente viene diagnosticata la patologia nella parente affetta (di solito prima della settima decade). Inoltre è stata individuata una correlazione non solo per i siti concordanti di neoplasia ma anche per localizzazioni differenti. Ad esempio, le pazienti colpite da cancro della mammella e familiarità per tumore del colon-retto avevano un odds ratio (OR) pari a 1,5; mentre per quelle con tumore ovarico e familiarità per neoplasia mammaria tale valore saliva a 2,3 suggerendo la presenza di fattori genetici all'origine della multipla presentazione neoplastica in nuclei familiari vicini [23].

Altri fattori non modificabili ma di estrema importanza in quanto responsabili della neoplasia mammaria ereditaria che costituisce dal 5 % al 10 % della casistica generale, sono le modificazioni genetiche. Negli anni '90 sono stati infatti identificati i due geni: BRCA1 e BRCA2, a tutt'oggi maggiormente associati prevalentemente alla neoplasia mammaria. Il primo, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17, comporta un rischio cumulativo stimato del 65% (CI 95% 44-78) di sviluppare il tumore della mammella fino all'età di settant'anni. A ciò si associa una probabilità alta di tumore ovarico se la mutazione si presenta all'estremità 5' del gene. Il BRCA2 è invece situato sul braccio lungo del cromosoma 13, in posizione 12.3. Il rischio cumulativo stimato di tumore della mammella in caso di mutazione è del 45% (IC 95% 31-56) fino all'ottava decade, ma a tale gene si associa anche un'alta incidenza di tumore della mammella maschile e di tumore ovarico [22, 24]. Per tali categorie di donne particolarmente a rischio, in quanto associate ad una spiccata familiarità per il cancro della mammella, insieme ad una documentata mutazione dei geni implicati nella patologia, le normali procedure di screening risultano essere insufficienti nel garantire una diagnosi precoce. Complessivamente le donne che presentano familiarità per tumore della mammella hanno un rischio relativo (RR) di sviluppare la patologia rispetto alla popolazione generale pari a 1,8, mentre per quelle portatrici della mutazione a carico del gene BRCA 1 tale valore sale rispettivamente a 30 ed a 11 per il gene BRCA 2. Alla luce di queste considerazioni la sola esecuzione dell'esame mammografico, unito anche a quello ecografico, garantisce una sensibilità diagnostica solo del 49%. Per questo nelle donne particolarmente a rischio si consiglia l'esecuzione della risonanza magnetica. Tale esame presenta un'elevata sensibilità (circa il 100%) nel rilevare la patologia mammaria, consentendo di anticipare la diagnosi ad uno stadio più favorevolmente trattabile [22, 25].

Altre caratteristiche genetiche fortemente correlate con la neoplasia mammaria sono le mutazioni dei geni PTEN e p53[22, 26].

I fattori di rischio modificabili comprendono invece le caratteristiche di riproduzione (nulliparità, prima gravidanza tardiva), obesità, alcool, attività fisica, assunzione di ormoni esogeni (contraccettivi orali, terapia ormonale sostitutiva), e probabilmente la dieta. Ad esempio secondo uno studio caso-controllo randomizzato e multicentrico denominato DIANA (Diet and Androgens) -5, un regime alimentare basato sulla dieta Mediterranea - macrobiotica può ridurre l'incidenza di tumore mammario [27].

Alcuni fattori di rischio, precedentemente citati, risultano validi anche per il tumore mammario maschile il quale costituisce poco meno dell'1% delle diagnosi totali. Secondo i dati ricavati da 17 registri tumori americani, nell'uomo, la neoplasia mammaria, si presenta di grado istologico inferiore e spesso positiva ai recettori ormonali. Nonostante tali caratteristiche favorevoli, i nuovi casi si presentano ad uno stadio più avanzato comportando così un miglioramento della sopravvivenza meno marcato rispetto alla casistica femminile. Comparando le diagnosi registrate fra il 1976 e il 1985 rispetto a quelle tra il 1996 ed il 2005, la diminuzione della mortalità fra le pazienti di sesso femminile è stata infatti del 42% a dispetto del solo 28% per quella maschile [26].

La sopravvivenza complessiva a cinque anni delle pazienti americane è passata dal 75.1% fra il 1970 e il 1977 al 90% degli anni compresi tra il 2001 ed il 2007.

Il 60% dei tumori mammari diagnosticati riguarda quelli appartenenti ad uno stadio localizzato per i quali la sopravvivenza relativa a cinque anni corrisponde al 98.6% scendendo fino al 23.3% per i tumori della mammella con localizzazione a distanza.

La *classificazione TNM* utilizza tre parametri per definire i diversi stadi della patologia tumorale maligna: T (Tumor: dimensione ed estensione tumorale), N (Nodes: coinvolgimento delle stazioni linfonodali), M (Metastasis: presenza di metastasi a distanza). Dalla correlazione di tali valori nasce la distinzione in stadi per un totale di quattro. Le donne con diagnosi di carcinoma mammario allo stadio I o II sono trattate, nel 57% dei casi, con chirurgia mammaria conservativa (BSC), il 36% è sottoposto a mastectomia, nel 6% dei casi non viene eseguito alcun trattamento chirurgico e solo l'1% non riceve nessun tipo di trattamento.

L'approccio terapeutico del carcinoma mammario prevede l'intervento di un team multidisciplinare che si avvale di competenze diagnostiche, mediche, chirurgiche e radioterapiche. Nella maggior parte dei casi l'associazione della chirurgia alla terapia

radiante risulta risolutiva, solo ad un terzo delle pazienti viene associata anche la chemioterapia. Al contrario nei casi di carcinoma mammario agli stadi III o IV, il programma terapeutico si basa sul trattamento chemioterapico in aggiunta a quello chirurgico o altri tipi di terapie [28]. Le caratteristiche cliniche e molecolari, dopo la chirurgia primaria, consentono di valutare l'evoluzione della patologia prima di una eventuale trattamento sistemico, sono definite come *fattori prognostici*.

La scelta di elaborare tali fattori trova le sue radici nella necessità di cambiamento per quanto riguarda l'approccio terapeutico del tumore della mammella. Nel diciannovesimo secolo tale patologia veniva curata con la sola metodica chirurgica basata sulla mastectomia totale eseguita seguendo la tecnica di Halsted. Asportando la ghiandola mammaria in toto, le relative strutture muscolari ed operando uno svuotamento del cavo ascellare corrispondente si pensava di evitare la disseminazione metastatica successiva. Il potenziale di diffusione del tumore della mammella era infatti visto secondo uno schema organizzato che iniziava dalla ghiandola mammaria per proseguire poi al distretto linfonodale ascellare ed estendersi infine, per opera della disseminazione ematogena, agli altri organi. Purtroppo solo il 12% delle pazienti trattate con mastectomia totale riusciva a sopravvivere per un periodo superiore ai dieci anni dall'intervento, senza considerare che il 20%-30%, con negatività linfonodale, presentavano successivamente metastasi a distanza. Da ciò è nato il concetto della presenza delle micrometastasi, secondo cui anche pazienti che presentano al momento della diagnosi tumori mammari allo stato iniziale possono nascondere tale aspetto, comportando quindi un rischio considerevole di progressione della patologia[29].

In seguito a queste valutazioni è nata la necessità di individuare il gruppo dei fattori prognostici e predittivi per tre ragioni principali: identificare le pazienti con tumore della mammella a prognosi favorevole per le quali una terapia adiuvante non apporterebbe benefici tali da giustificarne i relativi effetti collaterali. Al contrario per le pazienti che presentano prognosi sfavorevole dovrebbe essere evitato un approccio terapeutico eccessivamente aggressivo. L'ultimo motivo è costituito dal tentativo di selezionare quei tumori della mammella che devono essere trattati con una combinazione di differenti opzioni terapeutiche.

Il primo gruppo di fattori prognostici risulta essere quello più consolidato nella pratica clinica in quanto indicativo delle potenzialità di crescita e metastatizzazione della

patologia, nonché dell'outcome clinico della paziente prima che sia sottoposta ad una eventuale terapia sistemica.

Le caratteristiche patologiche del tumore mammario sono da tempo collegate ad un diverso significato prognostico. Oltre agli istotipi meno frequenti, come il carcinoma midollare, quello tubulare o il mucinoso puro che hanno un decorso clinico più favorevole, il carcinoma della mammella più frequentemente diagnostico si presenta nella forma di carcinoma lobulare infiltrante e soprattutto come carcinoma duttale infiltrante[30] . Comparando la sopravvivenza a lungo termine ed il comportamento metastatico delle due distinte patologie, il carcinoma duttale infiltrante presenta una maggiore tendenza alla successiva ripresa loco regionale ed alla metastatizzazione viscerale rispetto al lobulare infiltrante [31].

Il grado istologico del carcinoma della mammella viene individuato in base a diverse metodiche di catalogazione. Quella maggiormente utilizzata è rappresentata dalla classificazione di Scarff-Bloom-Richardson che considera in termini numerici (fino ad un massimo di 10) l'indice mitotico, la differenziazione ed il pleomorfismo nucleare assegnando a tali caratteristiche un preciso grado (da 1 a 3) in base alla loro presentazione. Le neoplasie con punteggio da 1 a 3 vengono definite “ben differenziate” e quindi corrispondenti al grado 1. Quelle con valore da 6 a 7 rappresentano le “moderatamente differenziate” (grado 2), mentre quelle con punteggio da 8 a 9 sono definite “scarsamente differenziate” (grado 3). Il grado istologico viene considerato un fattore di minore importanza, ma diventa rilevante nelle pazienti con linfonodi ascellari negativi e dimensioni tumori considerevoli, rappresentando un elemento indispensabile nella selezione dei casi a rischio.

L'indice mitotico misurato, che misura il numero delle mitosi sulla sezione istologica, è stato col tempo affiancato dalla determinazione di anticorpi correlati con la proliferazione come il MIB-1 e la valutazione delle cellule in fase S[30] . Tali parametri risultano essere di particolare importanza nella casistica di pazienti con neoplasia T1N0M0, per le quali, valori particolarmente elevati di tali fattori, corrisponderebbero ad una sopravvivenza libera da malattia (PFS) sfavorevole rispetto ai campioni istologici con valori inferiori [32].

I fattori precedentemente citati, definiti prognostici, si differenziano da quelli denominati *fattori predittivi*, i quali sono indicativi della sensibilità o resistenza ad una determinata terapia.

Queste due distinte categorie trovano però la loro intersezione in due fattori che vengono considerati sia di tipo prognostico che predittivo: la presenza delle proteine intracellulari con funzione di recettori per gli ormoni steroidei estrogenici (ER) e progestinici (PgR) e l'amplificazione dell'oncogene HER2/neu[30].

L'espressione dei recettori ormonali risulta essere di fondamentale importanza per l'eventuale somministrazione della terapia ormonale. Ultimamente la metodica di determinazione immunoistochimica (IHC) ha soppiantato il precedente procedimento di analisi con il carbonio destrano, in quanto meno inficiabile dal livello ormonale endogeno della paziente. Nonostante tali migliorie, circa il 20% delle analisi immunoistochimiche risultano essere inaccurate (risultanti falsi positivi o falsi negativi). Pertanto l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) in collaborazione con il College of American Pathologists (CAP), ha fornito delle linee guida sulla corretta esecuzione della metodica immunoistochimica in base all'analisi di 337 studi pubblicati in letteratura a partire dagli anni '90, da praticare in tutte le pazienti affette da carcinoma della mammella invasivo. Sono considerati "positivi" tutti i campioni presentanti almeno l'1% dell'espressione recettoriale[33]. Nei paesi industrializzati circa l'80% dei carcinomi invasivi della mammella presenta positività recettoriale almeno per gli estrogeni [34]. Le pazienti con espressione recettoriale positiva risultano avere una sopravvivenza globale (OS) del 92% ed una sopravvivenza libera da malattia (PSF) a 5 anni del 74%, mentre per le pazienti con recettori negativi tali valori scendono rispettivamente all' 82% ed al 66%. Occorre infine considerare che l'espansione clonale del tumore può convertire il fenotipo della patologia da quello "positivo" a quello "negativo", pertanto si consiglia l'eventuale rivalutazione dello stato recettoriale alla progressione della patologia, mentre risulta essere comprovato ormai da molti studi randomizzati l'inefficacia del trattamento ormonale per i tumori mammari con espressione recettoriale negativa[30].

Altro fattore, sia prognostico che predittivo, è rappresentato dall'oncogene HER2/neu (c-erbB-2). Tale gene rappresenta il corrispettivo umano del gene *neu* identificato nel neuroblastoma murino durante gli anni 80' [35]. Importanti sono anche le associazioni delle varie mutazioni genetiche. Ad esempio si è visto che l'alterazione di HER2 in combinazione con altri fattori di crescita non appartenenti alla famiglia di quelli epidermici, come il fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 1 (FGF1), vadano ad influenzare la sopravvivenza globale delle pazienti affette da tumore della mammella invasivo [36]. Anche la valutazione della mutazione a carico dell'oncosoppressore p53

associata all'amplificazione di HER2 è utilizzabile nell'identificazione dei carcinomi mammari a prognosi infausta e a maggior rischio di recidiva, mentre in assenza di alterazione la sola analisi di p53 non può fornire indicazioni prognostiche indipendenti [37].

L'impatto prognostico di HER2 risulta essere ormai consolidato per i tumori della mammella con metastasi linfonodali, mentre per quanto riguarda la casistica delle pazienti indenni da patologia nel distretto linfatico, soprattutto per le neoplasie di dimensioni uguali o inferiori al centimetro, non ci sono ancora studi definitivi a riguardo [38].

Come per i recettori ormonali, anche per Her2 è necessaria una successiva rivalutazione nel caso di malattia recidivante o metastatica anche dopo terapia neoadiuvante. L'espressione di ER e PgR possono mostrare una discordanza fra il tumore primitivo e la componente metastatica del 36% e 54,2% rispettivamente, oppure del 32,5% quando sono considerati insieme. Inoltre la maggioranza delle discordanze vanno dallo stato positivo a quello negativo. Per quanto riguarda HER2 tale condizione si ritrova invece in circa il 14% dei casi, comportando una successiva rivalutazione soprattutto terapeutica per le pazienti interessate [39].

Altra metodica utilizzata per l'analisi di HER2, oltre la HIC e la FISH, consiste nel misurare l'HER2 ECD ovvero la porzione esterna del recettore, rilasciata nel plasma a seguito dell'azione proteolitica delle metalloproteinasie, misurata con l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent-Assay (ELISA)[40]. Numerosi studi hanno evidenziato che i livelli di questo marcatore sono elevati mediamente nel 20% delle pazienti: la sua sensibilità passa dallo 0% in pazienti con cancro della mammella allo stadio iniziale fino al 40% per quelle con patologia metastatica diffusa. Il significato funzionale della liberazione di HER2 ECD non è stato ancora del tutto chiarito. Tuttavia dati in vitro sembrano suggerire che il distacco della parte extracellulare della molecola dia luogo alla formazione di un recettore troncato, indicato come p95, caratterizzato da una notevole capacità trasformante e innescando il segnale [41]. La proteina in questione risulta presente e fosforilata in cellule di cancro della mammella primitivo ed è stata associata con la presenza di metastasi linfonodali nelle pazienti con tumori mammari che sovra esprimono HER2 [42-44]. La liberazione in circolo di HER2 ECD potrebbe quindi dar luogo alla formazione di recettore costituzionalmente attivo, contribuendo a generare un fenotipo neoplastico più aggressivo. Risulta comunque esistere una discordanza anche nella rilevazione nell'amplificazione di HER2 ed elevati livelli di HER2 ECD, probabilmente dovuto al

fatto che la componente circolante dipende dalla massa tumorale e che quindi tumori di piccole dimensioni positivi alla determinazione su tessuto non lo siano altrettanto per la componente diffusa a livello del torrente circolatorio. Molti studi hanno cercato di valutare se HER2 ECD potesse essere considerato come fattore prognostico nel cancro della mammella considerando il suo impatto in termini di DFS (disease free survival, tempo di sopravvivenza libera da malattia) e OS (overall survival, sopravvivenza globale). Ad esempio, uno studio retrospettivo condotto su 701 affette da tumore della mammella localizzato o localmente avanzato (stadio I-III), ha correlato elevati livelli di HER2 prima della chirurgia, con valori ridotti di DFS ($p=0.003$) e OS ($p=0.002$) [45]. Gli studi condotti su pazienti con tumori in stadio avanzato hanno riportato una correlazione fra elevati livelli del marcatore circolante e prognosi infausta. In particolare Hayes e coll., analizzando 242 pazienti colpite da tumore della mammella metastatico, trattate con ormonoterapia e chemioterapia, nel 37% dei casi esaminati presentavano elevati livelli di HER2 ECD, e tale gruppo era correlato una prognosi peggiore[46]. Allo stesso modo Lipton e coll, analizzando l'outcome di 719 pazienti affette da tumore della mammella metastatico, arruolate in tre studi precedenti, hanno rilevato che il 30% dei casi era associato ad elevati livelli della componente circolante di HER2 e che questi erano associati ad una diminuzione considerevole sia del TTP(tempo a progressione), che dell'OS (17.2 mesi vs 29.6 mesi, $p<0.001$) .Da quanto sopra esposto si può quindi dedurre che esiste una correlazione prognostica sfavorevole per le pazienti con tumore della mammella presentante elevati livelli di HER2, soprattutto per quanto riguarda la componente recettoriale esterna circolante e tale aspetto si può facilmente esplicitare in termini di ridotti TTP, OS o DFS [47].

Altri fattori prognostici precedentemente citati e fondamentali nella pratica clinica sono quelli classificati in base alla stadiazione TNM:le dimensioni del tumore e l'invasione linfonodale . Questi fattori possono essere fra loro strettamente correlati in quanto spesso una neoplasia di notevoli dimensioni si presenta associata ad un coinvolgimento linfonodale loco-regionale ma non tutti presentano queste caratteristiche. Carter e coll, analizzando 24.740 casi di pazienti americane colpite da tumore della mammella e registrati nel programma Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), hanno riscontrato che i valori di OS a cinque anni variavano dal 45.5% per le neoplasie di diametro uguale o superiore ai cinque centimetri associati a linfonodi ascellari positivi, al 96.3% nei casi di tumori inferiori ai due centimetri senza coinvolgimento linfonodale. Le

dimensioni della neoplasia e lo stato linfonodale devono però essere considerati come fattori prognostici additivi ma indipendenti in quanto l'interessamento linfonodale veniva associato ad un andamento della patologia sfavorevole indipendentemente dalle dimensioni, considerandolo quindi come fortemente indicativo della capacità di diffusione metastatica rispetto alla sola indicazione dimensionale della neoplasia [48].

Rosene coll., hanno analizzato la correlazione esistente fra dimensioni del tumore della mammella ed OS con follow-up a lungo termine (circa 20 anni), in un gruppo di 767 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario comprendente vari istotipi ma tutti a prognosi favorevole in quanto T1N0M0/T2N0M0. 219 pazienti (29% dei casi) si presentavano con carcinoma duttale o lobulare infiltrante di dimensioni uguali o inferiori al centimetro, oppure erano colpite dai tumori della mammella istologicamente rari ma della grandezza uguale o inferiori ai tre centimetri. Per questo gruppo di pazienti i valori di OS risultavano pari a 91% e 87% rispettivamente considerando un follow-up di dieci e venti anni. I casi di neoplasia della mammella a prognosi meno favorevole (548 pazienti, 71% dei casi), in quanto con valori dimensionali superiori al centimetro per i carcinomi duttali e lobulari infiltranti e per le neoplasie a istotipo raro quelle superiori ai tre centimetri, hanno mostrato una riduzione in termini di OS del 73% e 68% a 10 e 20 anni rispettivamente [49]. Da ciò si deduce che nonostante ci siano caratteristiche fondamentali di presentazione della neoplasia mammaria, in primis il coinvolgimento linfonodale, ma anche il tipo ed il grado istologico, esista comunque una soglia di criticità dimensionale grazie alla quale viene sicuramente favorita la diffusione metastatica e che tale valore risulti essere inferiore quanto più il tumore assuma dimensioni maggiori [50].

Il fattore prognostico più significativo nei casi di tumore della mammella di stadio iniziale è costituito comunque dalla presenza di positività linfonodale ascellari, esistente una relazione diretta fra il numero dei linfonodi coinvolti e la disseminazione a distanza delle cellule neoplastiche [30]. La maggior parte degli studi clinici, per semplicità, considera ormai quattro gruppi principali di stratificazione del cancro della mammella in considerazione del coinvolgimento linfonodale ascellare sulla base di quello che viene chiamato National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP). La prima categoria riguarda le pazienti con linfonodi ascellari negativi, seguita da quelle rispettivamente che hanno da uno a tre, da quattro a nove ed infine più di dieci linfonodi ascellari interessati. I valori di OS a cinque anni per i vari gruppi corrispondono a 82.8% per il primo gruppo, mentre per i restanti risultano essere 73%, 45.7% e 28.4% [51]. In

passato lo studio dei linfonodi ascellari veniva eseguito in seguito alla dissezione ascellare omolaterale eseguito rimuovendo le stazioni linfonodali di primo e secondo livello. Questo tipo di approccio chirurgico è stato sostituito dalla tecnica di biopsia del linfonodo sentinella (BLS), eseguita per la prima volta nel 1990 al fine di analizzare la presenza di micrometastasi occulte nella via di drenaggio linfatico del melanoma cutaneo [52]. Quattro anni dopo è nata l'intuizione di utilizzare questa tecnica chirurgica mininvasiva e multidisciplinare anche per il tumore della mammella, in quanto le precedenti pazienti sottoposte a svuotamento del cavo ascellare presentavano sequele post-operatorie quali il linfedema dell'arto superiore interessato, che, anche se spesso di lieve entità, comportava una considerevole limitazione funzionale dell'arto stesso[53]. Inizialmente si procedeva iniettando un colorante vitale (tipo blu di Evans) presso il sito di localizzazione del tumore mammario primario permettendo in seguito l'identificazione della prima stazione linfonodale ascellare interessata che veniva quindi asportata ed analizzata in quanto sede iniziale di diffusione metastatica[54, 55]. Successivamente sono stati introdotti i radioisotopi, macroaggregati di albumina umana coniugati con Teczenio radioattivo (^{99m}Tc), di cui la letteratura ne ha ormai certificato la superiorità rispetto ai coloranti vitali che però continuano ad assumere un ruolo predominante nell'individuazione del linfonodo sentinella, specie se in associazione con i primi. Secondo una revisione della letteratura basata su 4791 procedure condotte dal 1993 al 1999, la percentuale di identificazione del linfonodo sentinella risultava essere dell'80,7% utilizzando la metodica del colorante vitale, mentre per quanto riguarda la casistica dei radioisotopi tale valore saliva al 91.8% arrivando al 93,1% con la combinazione dei due traccianti [56]. Negli anni successivi il livello di identificazione del linfonodo sentinella raggiunto, grazie alle migliorie tecnicamente apportate, si presenta del 97.3% in combinata, mentre per le due tecniche, analizzate separatamente, risulta essere dell'89.3% per il colorante vitale e del 95.8% per il radioisotopo [56]. L'uso del radiotracciante si è dimostrato costantemente più efficace in quanto risulta essere meglio standardizzato, meno vincolato all'esperienza specifica dell'operatore e consenta una visualizzazione pre-operatoria del drenaggio linfatico tramite l'esecuzione dell'esame linfo-scintigrafico. Tuttavia è interessante sottolineare come la combinazione delle due metodiche permetta l'identificazione di linfonodi sentinella discordanti nel 4%, che potrebbero quindi risultare falsamente negativi utilizzando un solo tracciante. Uno studio prospettico multicentrico ha infatti verificato la riduzione significativa dei falsi negativi dal 13% al 5.8% utilizzando la

tecnica combinata, poiché in caso di linfonodi sentinella multipli, tale procedura permette di ottenere una più accurata stadiazione ascellare [57]. Lo studio dello stato linfonodale ascellare rappresenta indubbiamente uno dei fattori prognostici inconfutabili nella gestione delle pazienti con carcinoma mammario primitivo in quanto le pazienti con quattro o più linfonodi coinvolti alla diagnosi iniziale presentano un outcome peggiore, dopo ricaduta, rispetto ai casi presentatisi con linfonodi indenni da malattia. Da qui si evidenzia che l'interessamento metastatico linfonodale non risulta essere di fondamentale importanza solo nella fase diagnostica ma è indicativo di cancro della mammella con fenotipo maggiormente aggressivo [58]. Attualmente viene posta maggiore attenzione alla rilevazione, con l'utilizzo della biopsia del linfonodo sentinella, non solo delle macrometastasi ma anche di quelle che vengono chiamate micrometastasi, le quali assumono dimensioni inferiori ai 2 mm, al fine di scongiurare l'eventuale successiva disseminazione a distanza [59].

Nel panorama globale delle patologie oncologiche, il carcinoma della mammella viene considerato generalmente fra le neoplasie a prognosi favorevole. Nonostante ciò, le pazienti che si presentano alla diagnosi con malattia metastatica, o in seguito a terapie multidisciplinari di tipo medico-chirurgico, sono trattate con intento palliativo, dal momento che la progressione e l'exitus finale risultano essere pressoché inevitabili. Il 5%-10% delle pazienti si presenta alla diagnosi con carcinoma della mammella metastatico, di cui solo il 30% della casistica non presenta interessamento linfonodale ed il 70% con positività linfonodale, svilupperà metastasi a distanza [60]. In particolare il 10%-15% dei casi evolverà verso un quadro diffusamente metastatico entro due anni dalla diagnosi, con una sopravvivenza mediana a cinque anni del 21% [61]. Il decorso della malattia metastatica risulta essere altamente variabile presentando una progressione più o meno graduale. Fatta eccezione per alcuni casi sporadici a lunga sopravvivenza (10-20 anni) che costituiscono soltanto meno del 2% della casistica globale, in generale la sopravvivenza mediana della pazienti affette da cancro della mammella metastatico varia dai diciotto ai ventiquattro mesi considerando sia le caratteristiche intrinseche della patologia primaria in base ai fattori precedentemente citati che quelle relative ai secondarismi come il numero e la sede [62] [63]. Le sedi preferenziali per quanto riguarda l'interessamento metastatico viscerale sono costituite dal distretto polmonare epatico e per ultimo quello celebrale [64], ma con estrema frequenza vengono rilevate anche metastasi ossee in quanto nel tumore della mammella, insieme a quello prostatico,

l'apparato scheletrico rappresenta una delle localizzazioni maggiormente coinvolte nella patologia avanzata. Le metastasi ossee sono infatti state osservate nel 70% dei rilevamenti autoptici delle pazienti affette da tumore mammario ed in particolare lo scheletro assiale rappresenta la parte maggiormente colpita [65].

Analisi citogenetiche e di genetica molecolare hanno fatto emergere come lo sviluppo di un carcinoma primario della mammella, così come avviene per altre neoplasie, derivi da un processo multistep caratterizzato dall'accumulo di varie alterazioni genetiche. Tra i modelli esistenti, uno dei maggiormente riconosciuti risulta essere quello proposto da Wellings e Jansen, nel quale, a partire dall'epitelio mammario normale, grazie ad un processo di proliferazione cellulare, si può avere lo sviluppo di una iperplasia. Successivamente, per mezzo di variazioni nell'adesione e polarità cellulare, tale iperplasia può evolvere in una lesione premaligna, detta iperplasia atipica, capace di diventare carcinoma in situ ed infine, superando la membrana basale dell'epitelio mammario, carcinoma invasivo con capacità di metastatizzare (Wellings e coll. 1975).

La visione tradizionale del processo di disseminazione metastatica suggeriva che le cellule metastatizzanti del tumore primitivo infiltrassero lo stroma, i vasi linfatici e quelli sanguigni solo dopo un processo di selezione che portava all'acquisizione di alterazioni genetiche aggiuntive in grado di conferire loro capacità invasiva. Tale processo era quindi considerato una caratteristica evolutiva nelle fasi avanzate della progressione del tumore primario[66] [67].

Successivamente questo modello è stato messo in discussione analizzando il profilo genetico di tumori della mammella primitivi e dei relativi secondarismi. Analizzando la casistica delle pazienti affette da tumore della mammella con negatività linfonodale, nei casi che hanno in seguito sviluppato metastasi a distanza, la progressione della malattia sembrava dipendere da cellule neoplastiche disseminate per via ematica e presenti nella componente midollare già dalle prime fasi di sviluppo tumorale. In particolare, in seguito alla rimozione chirurgica della massa tumorale primaria, le pazienti che mostravano MDR (minimal residual disease, minima malattia residua) esprimevano positività per citocheratine presenti in micrometastasi occulte disseminate nel midollo osseo, incrementando così il rischio di ricaduta nelle pazienti affette da cancro della mammella non avanzato [[68]]. Oltre ai linfonodi, il midollo osseo costituirebbe quindi una sede privilegiata nella quale le cellule possono adattarsi a nuove condizioni ambientali e da qui migrare in altri organi. Per quanto riguarda la disseminazione ematica l'assetto genetico

particolarmente coinvolto in tale procedimento sembrerebbe essere anche quello relativo alle proteine coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella plasticità del citoscheletro [[69]].

Estremizzando i dati ottenuti dal profilig genetico siamo arrivati a proporre una classificazione molecolare del tumore della mammella costituita da cinque sottotipi principali di carcinomi mammari invasivi. Il primo è rappresentato dai *luminal A* caratterizzati da positività per i recettori estrogenici e progestinici ma HER2 negativi. I *luminal B* differiscono dai precedenti in quanto risultano positivi anche per HER2. Il sottotipo denominato *human epidermal growth factor receptor-2 overexpressing* presenta sovraespressione di HER2 (score 3+ alla reazione immunoistochimica) con recettori ormonali positivi. I restanti sottotipi sono costituiti dai *normal breast tissue-like* ed infine dai *basal-like* i quali presentano negatività sia per i recettori ormonali che per HER2 ed aumentata espressione delle citocheratine basali CK 5/6. All'interno di questi sottotipi esiste un'elevata eterogeneità. Recentemente è stato individuato un altro sottogruppo con caratteristiche simili a quello dei *basal-like* ma con la peculiarità di aver bassa espressione di claudine (proteine di giunzione cellulo-cellulari) e markers di cellule staminali, denominato *claudin-low*.

Con il termine *Triple negative breast cancer*(TNBC), a sua volta, si vuole identificare il gruppo immunofenotipico a cui appartengono gli ultimi due sottotipi precedentemente citati con i quali condividere la caratteristica di avere solitamente una prognosi negativa, e precisamente, circa il 75%, è costituito dai carcinomi della mammella classificati come *basal-like* [[70]]. Il tumore della mammella triplo negativo non presenta quindi positività per i recettori estrogenici e progestinici[33], è caratterizzato da mancata sovraespressione di HER2 e costituisce dal 9% al 21% di tutti i tumori mammari invasivi. Viene di solito diagnosticato come neoplasia di stadio avanzato ma la prognosi resta generalmente infausta anche quando la diagnosi viene posta precocemente in quanto la progressione del tumore triplo negativo si verifica fra il primo ed il terzo anno dopo trattamento primario, con disseminazione metastatica preferibilmente collocata a livello viscerale, soprattutto tessuto cerebrale, polmone e tessuti molli [71] [72]. Infine, in termini di OS, sembra che nelle pazienti di età superiore alla quinta decade, il carcinoma della mammella triplo negativo presenti valori maggiormente favorevoli a discapito di quelle più giovani [73]. In considerazione dell'andamento clinico particolarmente aggressivo del tumore della mammella triplo negativo e della sua precoce tendenza alla metastatizzazione, si è reso

auspicabile identificare, al fine di eliminarle con terapie mirate, le cellule ritenute coinvolte nel processo di disseminazione metastatica. Ultimamente un nuovo strumento, che promette di completare maggiormente il quadro prognostico delle patologie oncologiche, è rappresentato dalla ricerca delle cellule tumorali circolanti (circulating tumor cells, CTCs). Quest'ultime sono rare cellule individuate tramite analisi molecolare e rilasciate dalle neoplasie, anche nelle fasi precoci della progressione tumorale, nel torrente circolatorio e si pensa che abbiano un ruolo chiave nel processo di metastatizzazione. La presenza delle CTCs viene associata ad una prognosi peggiore in diverse patologie oncologiche come il tumore della mammella ma anche quello prostatico o colon-rettale [74]. E' noto come non tutte le cellule tumorali, le quali si distaccano dalla massa primaria, siano effettivamente in grado di impiantarsi in organi secondari, in quanto, nella circolazione sistemica, sono soggette sia a fenomeni di immunomodulazione che a forze di pressione emodinamica tendenti ad eliminarle. Studi eseguiti su modelli animali, per indagare la progressione metastatica a livello polmonare ed epatico, mostrano come le fasi meno rilevanti nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche non siano quelle precoci riguardanti la sopravvivenza in circolo, l'arresto e la fuoriuscita di tali cellule dai vasi sanguigni, bensì quelle successive implicate nella mancata crescita delle cellule tumorali circolanti e delle micrometastasi attraverso il procedimento di inefficienza metastatica [75].

Il concetto di utilizzazione delle CTCs come marcatore di malattia microscopica, considerandole una sorta di "biopsia liquida", ha aperto la possibilità di identificare cellule in transito dal tumore primitivo nella rete vascolare prima della consueta evidenza radiologica di secondarismi in organi a distanza. La metodica approvata dalla FDA (Food and Drug Administration) per l'identificazione delle CTCs utilizza il sistema CellSearch™, cioè una tecnica di isolamento cellulare basata sulla cattura, tramite anticorpi per specifici antigeni di superficie epiteliali delle CTCs, che si avvale dell'utilizzo di antigeni non espressi nei leucociti. Tra questi EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) è l'antigene più usato per la sua universale espressione nelle cellule di origine epiteliale e la sua assenza nelle cellule nucleate di origine leucocitaria, insieme all'utilizzo di anticorpi anti-EpCAM coniugati con briglie magnetiche, seguite da un processo di purificazione degli elementi cellulari catturati dal campo magnetico stesso, sta alla base del sistema CellSearch™. Le briglie, coniugate con anticorpi anti-EpCAM per catturare le CTCs, vengono successivamente colorate con un cocktail di anticorpi

anticitocheratine come CK8, CK18 e CK 19, mentre la colorazione per il marker leucocitario comune CD45, viene usata come controllo. Gli studi clinici di validazione per tale metodica hanno stabilito per il carcinoma della mammella metastatico un cut-off di 5 cellule in 7.5 ml di sangue periferico, considerando livelli superiori di CTCs indicativi di prognosi infausta sia in termini di PFS che di OS[76].

I meccanismi di dinamica e selezione delle CTCs sono ancora oggetto di studio. L'evidenza di piccoli gruppi di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico lascia comunque ipotizzare che esse siano in grado di replicarsi durante la loro permanenza nel torrente circolatorio dando origine a clusters risultando maggiormente predisposti all'impianto e alla crescita tumorale in organi secondari. Tuttavia, in modelli sperimentali, è stato osservato che solo il 3% delle CTCs disperse a livello ematico si trovano in uno stato proliferativo, mentre le rimanenti si trovano in uno stato di cosiddetta dormienza, incapaci cioè sia di attività replicativa che apoptotica [77]. Lo stato di dormienza cellulare è di fondamentale importanza dal punto di vista clinico, in quanto CTCs e micrometastasi dormienti in organi a distanza non hanno perso la loro capacità tumorigenica, potendo infatti riprendere il processo di proliferazione neoplastica al cessare delle condizioni che le mantengono in tale stato (come fenomeni di immunomodulazione, acquisizioni di nuove mutazioni che ne modificano il fenotipo, scomparsa di inibitori dell'angiogenesi circolanti dopo rimozione del tumore primitivo o aumento dei fattori di crescita stimolanti la proliferazione)[78]. Questo potrebbe spiegare i casi di ripresa di malattia osservati in pazienti affette da cancro della mammella anche a distanza di molti anni dal trattamento sia chirurgico che oncologico specifico. La maggior parte delle pazienti affette da tumore mammario presentano CTS i quali esprimono un particolare tipo di citocheratina (CK19), considerata marker putativo delle cellule staminali. Questo ha fatto ipotizzare che, una parte delle CTCs presenti durante la fase precoce dello sviluppo neoplastico, possano considerarsi cellule staminali putative, non replicanti in situ e resistenti al trattamento chemioterapico. Da questa constatazione è nata la teoria delle cellule tumorali staminali (cancer stem cells), che guiderebbe fenotipo e storia clinica dei vari sottotipi molecolari di carcinoma della mammella[79].

Il trattamento del setting metastatico ha sempre avuto usualmente un intento palliativo, tuttavia, recenti studi suggeriscono un lento miglioramento nella gestione di tale patologia. Gli obiettivi principali del trattamento medico sono infatti costituiti dal miglioramento in termini di PFS e OS, dal controllo e dalla palliazione della

sintomatologia e dal miglioramento della qualità della vita. I trattamenti sistemici sono in continua evoluzione. Ad oggi numerosi sono gli agenti antitumorali attivi ed efficaci così come i nuovi farmaci biologici sono ormai diventati parte integrante della terapia stessa. La terapia sistemica, endocrina, citotossica e biologica può essere somministrata sequenzialmente, in combinazione o come singolo trattamento. Da questo presupposto nasce l'importanza di selezionare lo schema terapeutico ottimale in base al profilo di tossicità, ai fattori predittivi di risposta e conformandolo in considerazione delle caratteristiche della paziente (età, performance status, comorbidità, disponibilità delle terapie e accesso alle stesse, preferenze della paziente medesima) e della neoplasia (intervallo libero da malattia, precedenti terapie effettuate e conseguente risposta, assetto recettoriale e livello di espressione di HER2 sia del tumore primitivo che delle metastasi, aggressività biologica).

1.2 Trattamento medico della malattia metastatica HER2 negativa

Come accennato precedentemente, il trattamento del carcinoma della mammella metastatico si avvale di molteplici strategie terapeutiche rispetto al passato in quanto, fino a non molti anni fa, la malattia avanzata veniva considerata incurabile nella maggior parte dei casi e la scelta del clinico aveva, come obiettivo principale, la palliazione sintomatologica allo scopo di non inficiare ulteriormente la qualità della vita della paziente ed il contenimento della crescita neoplastica. Ad oggi, invece, il prolungamento della sopravvivenza rappresenta un obiettivo sempre più realistico e prioritario. In considerazione della eterogeneità di tale patologia, le pazienti possono essere classificate in due gruppi: a basso rischio di evoluzione, le quali presentano usualmente ormonoresponsività, mancata amplificazione di HER2 e caratteristiche clinico-patologiche di scarsa aggressività (come DFS maggiore di due anni, impegno scheletrico o dei tessuti molli senza coinvolgimento degli organi vitali nella disseminazione metastatica) ed il gruppo definito ad alto rischio di ripresa, relativo alla casistica solitamente non endocrinoresponsiva, presentante amplificazione di HER2 e malattia rapidamente aggressiva (DFS minore di due anni, elevato numero di siti metastatici e con localizzazioni viscerali estese).

Il trattamento ormonale rappresenta storicamente la prima forma di approccio medico per il tumore della mammella, stabilita su osservazioni in pazienti ooforectomizzate, e costituisce un'opzione ampiamente utilizzata nelle forme endocrinoresponsive con malattia scarsamente aggressiva, in quanto tale regime terapeutico ha il vantaggio di essere efficace e di non penalizzare la qualità della vita della paziente grazie alla scarsa tossicità. Storicamente, il tamoxifene rappresenta uno dei cardini della terapia ormonale utilizzata nel carcinoma della mammella metastatico da oltre trent'anni. Si tratta di un farmaco appartenente alla classe dei SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators), ma successivamente, a causa degli episodi di ormonoresistenza, sono stati introdotti gli inibitori dell'aromatasi, appartenenti invece alla classe dei SERDs (Selective Estrogen Receptor Downregulators). Nonostante l'identificazione di stimate di resistenza al trattamento ormonale, come la concomitante espressione o amplificazione di HER2 o la scarsa espressione di recettori ormonali, in seguito all'introduzione di agenti ormonali sempre più potenti e con migliore profilo di effetti collaterali rispetto ai precedenti, gli inibitori dell'aromatasi di terza generazione, sia non-steroidi come letrozolo ed

anastrozolo, che steroidei come exemestane, costituiscono il trattamento di prima linea per le pazienti con carcinoma della mammella metastatico in postmenopausa in quanto reputati di maggior efficacia, più selettivi, meglio tollerati e capaci di inibire i siti endogeni di produzione degli ormoni estrogenici [80][60]. Quattro studi randomizzati di fase III, hanno dimostrato la superiorità o presentano un disegno di non inferiorità, degli inibitori dell'aromatasi rispetto al tamoxifene come trattamento di prima linea nel tumore della mammella metastatico nelle pazienti in postmenopausa. In tutti gli studi, le pazienti potevano avere ricevuto tamoxifene in fase adiuvante (ammesso che fosse stato sospeso da 6-12 mesi, anche se i casi presentanti tali caratteristiche ne costituivano una porzione minoritaria, cioè dal 7.5% al 18.5%), ed avevano come end point primario il tempo a progressione di malattia (TTP, time to treatment progression), inteso sia come il periodo intercorrente fra la randomizzazione e la progressione di malattia, sia la morte causata dalla neoplasia, qualunque dei due eventi si fosse verificato prima. I primi due studi, con disegno di superiorità, hanno evidenziato risultati simili; in particolare, nel primo, condotto da Mouridsen e coll., delle 907 pazienti con diagnosi di malattia metastatica arruolate, 453 sono state randomizzate a ricevere letrozolo (2.5 mg/die) con somministrazione orale (os), mentre le restanti 454 hanno ricevuto tamoxifene (20mg/die) per os. L'end point primario dello studio, è stato raggiunto in quanto letrozolo ha dimostrato superiorità in TTP di circa 3.5 mesi rispetto al tamoxifene (41 vs 26 settimane rispettivamente; HR=0.70, 95% CI:0.60-0.82; p=0.0001) [81]. Nel secondo studio di fase III randomizzato che confrontava exemestane con tamoxifene per lo stesso setting di pazienti, condotto da Paridaens e coll., la differenza non è risultata statisticamente significativa, rilevando comunque un considerevole beneficio in termini di TTP (8.9 vs 5.2 mesi, HR=0.89; 95% CI: 0.67-1.05; p=0.121) nelle pazienti sottoposte a trattamento con inibitore dell'aromatasi [82]. Una delle possibili spiegazioni di questo risultato probabilmente risiede nel fatto che in quest'ultimo trial l'ipotesi statistica stimava una differenza relativa del 30% a favore dell'exemestane, rispetto al primo studio nel quale tale valore scendeva al 20%.

Gli altri due studi, con disegno statistico di non inferiorità, hanno visto entrambi la comparazione di anastrozolo con tamoxifene come trattamento di prima linea nel cancro della mammella metastatico nelle pazienti in post menopausa. Nello studio multicentrico di fase III condotto da Bonnetterre e coll., 668 sono state randomizzate a ricevere anastrozolo (1mg/die) o tamoxifene (20 mg/die) per os, mostrando un tempo a

progressione sovrapponibile (8.2 mesi vs 8.3 mesi rispettivamente, HR=0.99; 95% CI: 0.86), soddisfacendo i termini di non inferiorità dell'inibitore dell'aromatasi rispetto a tamoxifene [83]. L'altro studio multicentrico randomizzato, condotto da Nabholz e coll., si presentava utilizzando lo stesso setting di pazienti e, come il precedente, ha evidenziato un trend positivo a favore di anastrozolo, in quanto il TTP è stato di 5.5 mesi in più a favore dell'inibitore dell'aromatasi (11.1 mesi vs 5.6 mesi; HR=1.44; 95% CI: 1.16; p=0.005) [84]. Complessivamente tutti gli studi hanno dimostrato un tasso di risposte obiettive (ORR) dal 21% al 46% nelle pazienti in trattamento con inibitore dell'aromatasi e fra il 17% ed il 31% per quelle a cui è stato somministrato tamoxifene. Nonostante non sia stata evidenziato in tutti e quattro gli studi un vantaggio in termini di sopravvivenza globale (OS), ad eccezione di letrozolo, l'utilizzo degli inibitori dell'aromatasi come ormonoterapia di prima linea nelle pazienti in postmenopausa affette da tumore della mammella metastatico, rimane l'opzione terapeutica preferibile, anche se l'utilizzo di tamoxifene rappresenta un'opzione ragionevole come seconda linea di trattamento [60].

Un'ulteriore dilatazione delle scelte terapeutiche è stata fornita dall'introduzione di fulvestran, un antagonista che, causando la completa abrogazione della trascrizione dei geni estrogeno correlati, non presenta attività agonistiche e resistenza crociata con i farmaci precedenti. Fulvestran è stato comparato con anastrozolo in due studi di fase III randomizzati con analoghi criteri d'inclusione, ovvero in pazienti in postmenopausa con carcinoma mammario avanzato precedentemente sottoposte a trattamento endocrino. Complessivamente, in poco più della metà dei casi era stata somministrata endocrinoterapia di prima linea nello stadio avanzato mentre tutte le pazienti avevano ricevuto tamoxifene in fase adiuvante o nella malattia metastatica. L'end point primario per entrambi gli studi era fissato in TTP ed entrambi avevano un disegno statistico di non inferiorità. Nel primo (Trial 0021) condotto in Nord America, sono state arruolate 400 pazienti, seguite con follow-up mediano di 16.8 mesi. Il TTP mediano per fulvestran si è dimostrato essere di 5.4 mesi, a dispetto di quello relativo ad anastrozolo, del valore di 3.4 mesi (HR=0.92; 95% CI: 0.74-1.14; p=0.43), dimostrandone quindi la non inferiorità rispetto all'inibitore dell'aromatasi, in quanto un limite superiore dell'intervallo di confidenza pari a 1.25 è stato considerato indicativo di non inferiorità [85]. Nel secondo studio multicentrico, condotto nel resto del mondo (Trial 0020), 451 pazienti sono state randomizzate a ricevere anastrozolo (1 mg/die) per os, oppure fulvestran (250mg ogni

trenta giorni) con somministrazione intramuscolo (im). Il TTP mediano è stato di 5.5 mesi per fulvestran e di 5.1 mesi per l'inibitore dell'aromatasi (HR=0.98; 95% CI: 0.80-1.21; p=0.84) [86]. Un'analisi combinata di questi due studi ha confermato un TTP di 5.5 mesi per fulvestran e di 4.1 mesi per anastrozolo (HR= 0.95; 95% CI: 0.82-1.10; p=0.48), mentre la OS e il tasso di beneficio clinico (definito come tasso di risposta completa, parziale e di stabilità di malattia della durata di almeno sei mesi) sono risultati sovrapponibili [87]

In un altro studio multicentrico di fase III randomizzato (Trial 0025), condotto da Howell e coll., è stato confrontato ancora fulvestran con tamoxifene, ma in questo caso le pazienti non avevano ricevuto alcun trattamento sistemico per la malattia avanzata, né tamoxifene negli ultimi dodici mesi (cioè dopo il termine della terapia adiuvante). Nel complesso le pazienti che avevano ricevuto questo farmaco corrispondevano al 23%, mentre le pazienti arruolate in totale nello studio sono state 587. Il TTP, obiettivo primario dello studio, ha evidenziato una differenza assoluta di 1.5 mesi a sfavore di fulvestran rispetto a tamoxifene (6.8 mesi vs 8.3 mesi, p=0.088). Anche questo studio prevedeva un disegno statistico di non inferiorità ma tale criterio non è stato soddisfatto, in considerazione del fatto che, come precedentemente detto, il limite di confidenza pari a 1.25 sanciva la non inferiorità del fulvestran rispetto all'inibitore dell'aromatasi, ma in tale studio è stato ampiamente superato (HR=1.18; 95% CI: 0.98-1.44; p=0.088). Anche il tasso di beneficio clinico (54% vs 62%, p=0.026) si è dimostrato a sfavore di fulvestran. Tuttavia se si considerano solo le pazienti con recettori estrogenici e progestinici positivi, queste differenze scompaiono evidenziando dei risultati del tutto sovrapponibili in termini di TTP (8.2 mesi vs 8.3 mesi; p=0.39)[88]. Da questo punto di vista appare evidente che fulvestran rappresenti un'opzione terapeutica non inferiore agli inibitori dell'aromatasi (nello specifico ad anastrozolo), in pazienti in postmenopausa con carcinoma della mammella metastatico sottoposte ad endocrinoterapia, ma non può essere considerato come scelta primaria nei casi non pretrattati con ormonoterapia. La differenza nel controllo precoce di malattia a favore di tamoxifene, risiede probabilmente nel fatto che lo steady state di fulvestran viene raggiunto dopo tre-sei mesi di terapia, rispetto al tempo necessario con gli inibitori dell'aromatasi (sette giorni). Questa osservazione ha suggerito che l'azione del farmaco può essere potenziata attraverso una modificazione della posologia includendo una dose di carico (loading dose) all'inizio del trattamento. Modelli preclinici e studi di farmacocinetica hanno confermato la possibilità di ottenere, attraverso

una dose di carico, concentrazioni plasmatiche di fulvestran due volte superiori a quelle raggiunte con la somministrazione mensile convenzionale. Inoltre, una dose maggiore di fulvestran (500 mg), consente di raggiungere lo steady state in poche settimane dall'inizio del trattamento [89].

Su queste osservazioni si è basato il disegno di studi clinici randomizzati volti a verificare l'efficacia clinica di una schedula con dose di carico iniziale, seguita dal dosaggio standard di fulvestran (250 mg), oppure l'impiego diretto e ripetuto dello stesso farmaco ma ad alte dosi (500 mg). EFACT, uno studio multicentrico di fase III randomizzato, ha arruolato 693 pazienti in postmenopausa con carcinoma della mammella avanzato, ricadute durante trattamento in fase adiuvante o entro sei mesi dalla sospensione della stessa oppure in progressione di malattia nella fase avanzata durante ormonoterapia con inibitore dell'aromatasi non steroideo, randomizzandole a ricevere in doppio-cieco exemestane (25mg/die per os) o fulvestan (alla dose di carico di 500 mg im al giorno 0, 250 mg al giorno 14 e 28, successivamente somministrando 250mg im ogni 28 giorni). In termini di ORR i valori sono risultati pressoché sovrapponibili (7.4% per fulvestran vs 6.7% per exemestane, $p=0.736$), così come il tasso di beneficio clinico (32.2% vs 31.5%, $p=0.853$), mentre il TTP mediano è risultato identico (3.7 mesi, $p=0.6531$) per entrambi i trattamenti, senza differenze significative nel profilo di effetti collaterali. Questi dati permettono al clinico di poter scegliere, in pazienti con malattia avanzata precedentemente trattate con inibitore dell'aromatasi non steroideo (anastrozolo o letrozolo), un trattamento ormonale con inibitore dell'aromatasi steroideo (exemestane) oppure con fulvestran [90]. Lo studio di fase II randomizzato, FIRST, ha paragonato fulvestran 500 mg con anastrozolo, come trattamento di prima linea metastatico avendo come obiettivo primario il CBR (clinical benefit rate, definito in termini di risposta obiettiva e stabilità di malattia della durata di almeno sei mesi, 41.2% vs 35%; $p=0.386$) e l'ORR, che hanno fornito risultati sovrapponibili. Il TTP medio è risultato di 12.5 mesi per anastrozolo (HR=0.63; 95% CI 0.39-1; $p=0.0496$), mentre non è stato raggiunto per fulvestran al momento dell'analisi [91]. Infine CONFIRM, uno studio multicentrico di fase III randomizzato, ha confrontato l'efficacia e la tollerabilità di fulvestran alla dose di 500 mg e 250 mg. Delle 736 donne in postmenopausa (età media 61 anni) con diagnosi di cancro della mammella metastatico arruolate, 362 sono state randomizzate a ricevere il farmaco alla dose maggiore (500 mg im al giorno 0, seguito da 500 mg im al giorno 14 e 28, in seguito 500mg ogni 28 giorni), mentre alle restanti 374 è stato somministrato

fulvestran alla dose di 250 mg in ogni 28 giorni. Il trattamento che prevedeva la somministrazione del farmaco a posologia maggiore ha evidenziato una più lunga PFS, end point primario dello studio, di 1.1 mesi (6.5 mesi vs 5.4 mesi; HR=0.80; 95% CI 0.68-0.94; p=0.006), anche se non sono state evidenziate rilevanti discrepanze in termini di OS (end point secondario), né per quanto riguarda l'incidenza e la rilevanza di effetti avversi [92]. Questi dati risultano coerenti con quanto osservato nei precedenti studi con tale farmaco, inclusi quelli con dosaggi minori, e suggeriscono un beneficio in termini di controllo di malattia prolungato nei pazienti responders. In base a tali risultati, fulvestran 500 mg è attualmente registrato nel trattamento del carcinoma mammario metastatico ormonoresponsivo in pazienti in postmenopausa precedentemente trattate con terapia antiestrogenica.

La resistenza alla terapia endocrina risulta essere associata all'attività della via di segnale intracellulare che vede coinvolta una protein-chinasi chiamata mTOR (mammalian target of rapamycin). Nello studio di fase III randomizzato, BOLERO-2, è stato valutato un inibitore selettivo di tale proteina, everolimus (che legandosi ad una proteina chiamata FKBP-12, forma un complesso capace di inibire mTOR), in associazione di trattamento con exemestane in pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico ormonopositivo, pretrattate con inibitore dell'aromatasi non steroideo. Le 724 pazienti arruolate sono state randomizzate a ricevere, con un rapporto 2:1, exemestane in combinazione con everolimus o placebo. La PFS mediana, end point primario dello studio, è risultata a favore del regime di trattamento comprendente everolimus (10.6 mesi vs 4.1 mesi rispettivamente, $p < 0.001$), indicando che tale farmaco potrebbe rappresentare una valida opzione terapeutica per le pazienti con carcinoma della mammella metastatico con HER2negativo [93] [94].

In una meta-analisi basata su quattro studi randomizzati realizzati nel setting della malattia metastatica, realizzata su un totale di 506 pazienti, è stato dimostrato che nella paziente premenopausale, l'associazione di tamoxifene con ablazione ovarica tramite LHRH(luteinizing hormone-releasing hormone) analogo, si è dimostrata di maggiore efficacia rispetto al solo trattamento con LHRHa, in quanto capace di apportare un miglioramento significativo della PFS e della OS (2.5 anni vs 2.9 anni rispettivamente; 95%CI 0.63-0.96; $p = 0.02$)[95].

Sebbene la prima forma di trattamento medico per il tumore della mammella metastatico si basava sulla terapia ormonale, fin dalla loro introduzione, decenni più tardi, gli agenti

chemioterapici hanno dimostrato la loro efficacia in quanto capaci di fornire rapide risposte in contrapposizione ad effetti meno evidenti in pazienti sottoposte a manipolazioni endocrine di vario tipo. La chemioterapia rappresenta infatti il trattamento di riferimento nei casi presentanti malattia rapidamente evolutiva, con DFS minore di due anni, localizzazioni viscerali multiple o coinvolgimento degli organi vitali, nelle pazienti con negatività dello stato recettoriale o con malattia non più responsiva a trattamento endocrino. Tenendo conto della varietà di farmaci antitumorali attualmente a disposizione non è possibile definire un approccio standard per il trattamento chemioterapico della malattia metastatica, la scelta del clinico può ricadere così sia a favore di una monochimioterapia (preferibile in pazienti anziane, con scarsa riserva midollare, in condizioni generali critiche) sia di una strategia terapeutica che preveda l'utilizzo di un regime di associazione in considerazione delle caratteristiche clinico- patologiche precedentemente esposte, relative ad ogni singolo caso.

L'uso comune delle antracicline nella terapia adiuvante del carcinoma mammario ha incrementato l'incidenza di fenomeni di resistenza verso tali farmaci nel setting metastatico e pertanto ha ristretto l'utilizzo di tali antitumorali negli stadi più avanzati di tale patologia, con il fine di evitare fenomeni di tossicità dose-limite, in particolare la cardiotossicità. A seguito di tale fenomeno, negli ultimi anni si è registrato un incremento dell'utilizzo dei taxani nelle fasi precoci del trattamento del carcinoma mammario metastatico in pazienti pretrattate o meno con antracicline, da solo o in combinazione con le antracicline stesse [96]. Nel trial TAX 303, 326 pazienti precedentemente esposte ad agenti alchilanti, sono state randomizzate a ricevere docetaxel alla dose di 100mg/mq con somministrazione endovenosa (ev) al giorno 1 con cicli ogni 21 giorni, o doxorubicina (75 mg/mq ev al giorno 1 con cicli ripetuti ogni 21 giorni), per un massimo di sette cicli consecutivi. L'uso del taxano ha permesso di raggiungere un vantaggio in termini di ORR (47.8% vs 33,3%; $p=0.008$); in aggiunta con tale farmaco è stata riscontrata una minore incidenza di effetti collaterali sia di tipo ematologico (trombocitopenia, anemia), che non ematologico (neutropenia febbrile) [97].

Secondo una recente meta-analisi, in prima linea, i regimi di associazione a più farmaci, con particolare riferimento ad antracicline e taxani, sono più attivi rispetto all'uso sequenziale degli stessi, in quanto la polichimioterapia presenta un vantaggio statisticamente significativo in termini di ORR e PFS a fronte di una maggiore incidenza di effetti collaterali ed un impatto più limitato sulla OS [98]. L'unico studio di fase III

randomizzato, E1193, che paragona la combinazione tra tali farmaci rispetto al trattamento sequenziale monochemioterapico degli stessi, dimostra un beneficio in termini di ORR relativamente al tempo di fallimento terapeutico (time to treatment failure, TTF) [99]. Non solo la combinazione di più farmaci costituisce l'approccio terapeutico di prima linea nelle pazienti con tumore della mammella metastatico con buona performance status, malattia sintomatica o in rapida progressione, ma l'importanza dell'utilizzo dei taxani è stata evidenziata in tre meta-analisi recentemente condotte sulla base di studi randomizzati relativi a questo setting di pazienti. Nella prima, condotta da Bria e coll., sono state analizzate 2805 pazienti arruolate precedentemente in sette studi randomizzati, al fine di determinare se la combinazione di antracicline e taxani comportasse benefici rispetto al regime terapeutico standard di solo utilizzo delle antracicline. Anche se non è stato evidenziato un miglioramento significativo in termini di TTP e nessun vantaggio riguardo alla OS, i risultati più incoraggianti sono emersi valutando la ORR [100]. Allo stesso modo, la meta-analisi risalente allo stesso anno (2005) condotta da Gherzi e coll., ha confrontato fra loro regimi terapeutici contenenti o meno taxani in donne affette da cancro mammario metastatico, evidenziando, dai ventuno studi randomizzati analizzati, un considerevole beneficio sia in termini di OS (HR=0.93; 95% CI 0.86-1.00; p=0.05) che di TTP (HR=0.92; 95%CI 0.85-0.99; p=0.02) [101]. L'importanza di paclitaxel e docetaxel in associazione ad antracicline (come doxorubicina ed epirubicina) rispetto all'utilizzo sequenziale dei singoli agenti chemioterapici per il trattamento di prima linea della malattia metastatica, è stata infine evidenziata nella meta-analisi condotta da Piccart-Gebhart e coll. (condotta su 11 studi e 3953 pazienti totali). Dai risultati è emerso che la combinazione con taxani apporti incrementi considerevoli in termini di RR (57% vs 46%, p<0.001) e PFS (HR=0.92; p=0.031) in assenza di un vantaggio significativo in termini di OS, a differenza del trattamento monochemioterapico con soli taxani il quale ha evidenziato una uguale efficacia rispetto al solo utilizzo di antracicline in termini di RR, con risultati sfavorevoli relativamente invece alla PFS (HR=1.19; 95% CI 1.04-1.36; p=0.011) ed alla OS (HR=1.01; 95% CI 0.88-1.16; p=0.90)[102].

Nella valutazione di ulteriori regimi di associazione a più farmaci, sono stati condotti numerosi studi alla ricerca di combinazione comprendenti ancora taxani e antitumorali quali gemcitabina o capecitabina come trattamento di prima linea nel carcinoma della mammella metastatico. In uno studio di fase III randomizzato, condotto da Alabain e coll.,

è stata rilevata la superiorità della combinazione di paclitaxel con gemcitabina rispetto al solo trattamento con il suddetto taxano nella malattia metastatica precedentemente trattata con antracicline. 266 pazienti sono state randomizzate a ricevere gemcitabina (1250mg/mq ev al giorno 1 e 8) in associazione con paclitaxel (175 mg/mq ev al giorno 1), mentre alle restanti 263 pazienti è stato somministrato solo il taxano alla dose di 125mg/mq ev al giorno 1; per entrambi i bracci paclitaxel è stato somministrato con cicli di 28 giorni. L'end point primario dello studio, fissato in termini di OS, ha dimostrato la superiorità del regime di associazione (18.6 vs 15.8 mesi; $p=0.0489$) così come un più lungo TTP (6.1 vs 3.9 mesi; $p=0.0002$) ed un vantaggio in termini di RR (41.4% vs 26.2%; $p=0.0002$), a spese di una maggiore incidenza di neutropenia di grado 3 e 4 secondo la scala NCI (47.6% nel braccio di associazione vs 11.5% del solo paclitaxel) [103].

Per quanto riguarda l'associazione con capecitabina, nello studio di fase III randomizzato, condotto da O'Shaughnessy e coll., l'associazione di docetaxel con tale farmaco è risultata più efficace rispetto al solo trattamento con il taxano come prima linea nel carcinoma della mammella metastatico precedentemente trattato con antracicline. Nel braccio di associazione è stata rilevata una significativa superiorità del TTP (6.1 mesi vs 4.2 mesi, $p=0.001$), end point primario dello studio, nonché della OS (14.5 mesi vs 11.5 mesi; $p=0.0126$) ed RR (42% vs 30%; $p=0.006$), a fronte di una maggiore incidenza di effetti collaterali di grado 3 (secondo la scala NCI) di tipo gastrointestinale o hand-foot syndrome ma una minore frequenza di neutropenia febbrile, mialgie o artralgie, più comunemente riscontrate con la sola somministrazione del taxano [104]. Sulla base di tali considerazioni, è stato condotto uno studio randomizzato di fase III nel quale sono stati comparati due regimi di trattamento contenenti entrambi docetaxel associato a gemtamicina o capecitabina interessanti lo stesso setting di pazienti. L'end point primario dello studio, fissato in termini di PFS, non ha evidenziato sostanziali differenze fra i due bracci di trattamento, così come la OS. Per quanto riguarda il profilo di tossicità, l'associazione con capecitabina ha però dimostrato una maggiore incidenza di eventi avversi non ematologici (diarrea, mucosite ed hand-foot syndrome di grado 3-4 rispettivamente secondo la scala NCI), mentre nel regime con gemcitabina è stata riscontrato un lieve incremento di tossicità midollare (78% vs 66%; $p=0.025$) [105]. In considerazione della elevata frequenza di eventi avversi nei trattamenti comprendenti antracicline e taxani, una recente meta-analisi di studi randomizzati di fase II/III, ha esaminato il trattamento monochemoterapico di prima linea con sola capecitabina nella

malattia metastatica pretrattata con tali farmaci nelle pazienti HER2 negative, sulla base della scarsa tossicità e della capacità di tale farmaco di poter essere assunto per lunghi periodi grazie al profilo di sicurezza, con particolare riferimento alla mielosoppressione ed alopecia, ed alla mancata compromissione dei successivi schemi terapeutici applicabili alla progressione di malattia [106].

Nello studio registrativo di fase III, EMBRANCE, è stata valutata eribulina, come regime di trattamento in pazienti con carcinoma della mammella metastatico che avevano ricevuto dai due ai cinque regimi chemioterapici precedenti (due o più per la malattia avanzata) comprendenti antracicline e taxani se non controindicati. Tale farmaco, costituito da eribulina mesilato, rappresenta un nuovo inibitore dinamico dei microtubuli, analogo sintetico del macrolide naturale marino alicondrina B, e si ritiene che inibisca la fase di accrescimento dinamico dei microtubuli stessi, senza influire sulla fase di accrescimento, con la capacità di sequestrare la tubulina in aggregati non produttivi. Nello studio sono state randomizzate 762 pazienti totali, di cui 508 hanno ricevuto eribulina (1.4mg/mq ev al giorno 1 e 8 con cicli ripetuti ogni 28 giorni) mentre per le restanti la scelta dell'agente chemioterapico è stata a discrezione del ricercatore. La OS nella popolazione "intention-to-treat", end point primario dello studio, è risultata significativamente migliore nelle pazienti trattate con eribulina (mediana 13.1 mesi; 95% CI 11.8-14.3), rispetto al regime senza tale farmaco (mediana 10.6 mesi; HR=0.81; 95% CI 0.66-0.99; p=0.041), evidenziando inoltre profili di tossicità sovrapponibili. Sulla base di questi risultati, eribulina è stata registrata come trattamento da utilizzare dopo almeno due linee chemioterapiche, contenenti antracicline e taxani, nel setting metastatico [107]. Nonostante la chemioterapia rappresenti la pietra miliare nel trattamento della neoplasia mammaria, l'elevata tossicità limita spesso l'utilizzo degli agenti antitumorali. Inoltre è frequente lo sviluppo di resistenza, per cui, con la crescente comprensione alla base della biologia di tale patologia e l'avvento di sofisticate tecniche genomiche e proteomiche, sono state identificate numerose nuove terapie dirette contro specifici bersagli anticancro. Queste molecole sono implicate in diversi pathways molecolari rilevanti quali: la crescita tumorale, l'attivazione dei segnali di trasduzione, il ciclo cellulare e l'angiogenesi. Sulla base di queste considerazioni è stata introdotta nello scenario della terapia medica oncologica la classe di farmaci a bersaglio molecolare. Lo scopo degli anticorpi monoclonali è quello di interferire con il legame di un fattore circolante al proprio recettore impedendone la cascata trasduzionale. Nel tumore della mammella HER2

negativo non è possibile utilizzarne il capostipite, Trastuzumab, anticorpo monoclonale murino umanizzato diretto contro il dominio extracellulare del fattore di crescita epidermico di tipo 2, attualmente impiegato come trattamento di prima linea nella malattia metastatica in associazione a taxano per il setting di pazienti con espressione di HER2 [108]. La terapia biologica target è infatti diventata, negli ultimi anni, un'importante razionale di strategia terapeutica per il carcinoma mammario. Nonostante l'eterogeneità di tale patologia, sono state individuate un certo numero di alterazioni comuni nella fisiologia cellulare quali "key drives" di sviluppo e progressione tumorale. E' ormai accertato che l'angiogenesi sia essenziale per la crescita e la capacità metastatica delle cellule tumorali e questo ha fornito il razionale per la base di studi clinici volti a dimostrare l'efficacia dell'associazione di anticorpi monoclonali capaci di inibire tale processo, come Bevacizumab, in associazione a schemi conosciuti in quanto scevri dalle tossicità tipiche degli antitumorali. In particolare, tale farmaco si è affermato come opzione di riferimento nel trattamento di prima linea nel setting della patologia metastatica HER2 negativa, come verrà illustrato successivamente.

1.3 Bevacizumab nella terapia medica del tumore mammario

La ricerca preclinica ha identificato recentemente alcune terapie capaci di colpire selettivamente la crescita di cellule tumorali, lasciando indenni i tessuti risparmiati dalla patologia neoplastica. Una delle strategie finora seguite consiste nell'inibizione del processo angiogenetico in quanto le cellule tumorali, come le altre, necessitano di una vascolarizzazione che permetta loro di ricevere ossigeno ed altri nutrienti indispensabili al loro sostentamento, nonché di eliminare i propri cataboliti.

Il primo a chiarire questo concetto fu Glenn Algire nel lontano 1945, il quale sostenne che la rapida crescita tumorale dipendeva da un continuo sviluppo di nuovi vasi. Successivamente, Judah Folkman, nel 1971, propose per la prima volta il concetto secondo il quale i tumori non crescono oltre una certa misura senza l'ausilio di uno specifico sistema di rifornimento ematico a loro dedicato e che le neoplasie in fase di accrescimento liberano una sostanza ignota (tumor angiogenesis factor) che stimola la formazione di una nuova rete vascolare. Sulla base dell'osservazione il processo metastatico si sviluppa spesso dopo la rimozione del tumore principale per cui egli dedusse che le cellule neoplastiche producono fattori sia attivanti che inibenti l'angiogenesi, ipotizzando inoltre che gli inibitori dell'angiogenesi stessa potessero essere impiegati nella terapia oncologica.

Nonostante sia noto da tempo come la neoformazione di microvasi da parte delle cellule endoteliali accompagni la crescita tumorale e favorisca la disseminazione metastatica, l'identificazione e le caratteristiche costituzionali dei fattori di crescita coinvolti in questo processo sono stati definiti solo successivamente. Le neoplasie di piccole dimensioni, con diametro inferiore ai due millimetri, sono quiescenti e si nutrono per diffusione. Tuttavia, per il proprio sviluppo, il tumore deve conquistare l'accesso alla rete vascolare dell'ospite e creare una propria vascolarizzazione. Per questo obiettivo, la neoplasia si sottopone al cosiddetto "switch angiogenetico", derivante da uno squilibrio fra fattori pro-angiogenetici (VEGF, FGF, TGF- α , TGF- β , leptina, angiogenina) e quelli inibenti l'angiogenesi stessa (angiostatina, endostatina, IL-12, TSP-1, angiopoietina-2, interferone- α) [109].

L'importanza di comprendere il fenomeno angiogenetico risiede nella sua basilare implicazione nella patogenesi di una varietà di disordini fra cui: retinopatie proliferative, degenerazione maculare associata all'età (AMD), psoriasi, artriti reumatoidi e neoplasie.

In particolare, la neovascolarizzazione associata ai tumori, stabilendo una continuità con il sistema circolatorio, permette alle cellule cancerose, di esprimere la loro crescita e facilitarne la disseminazione metastatica[110, 111]. Tale processo è dunque indotto dalla sintesi e secrezione di fattori di crescita selettivi per le cellule endoteliali. Questi fattori, dotati di azione paracrina, possono essere prodotti dalla neoplasia medesima o da cellule immunitarie infiltratesi nel tumore come macrofagi, mastociti e linfociti. Il *basicFibroblastGrowth Factor* (bFGF) è stato il primo individuato; altri importanti pro-angiogenetici si è scoperto essere quelli appartenenti alla famiglia del FGF (*Fibroblast Growth Factor*), il TGF α (*Transforming Growth Factor alpha*) ma soprattutto al gruppo del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), la cui genesi è indotta da una elevata espressione di oncogeni quali ras, raf, scr, nonché da ipossia [112]. Il modello attuale di angiogenesi tumorale suggerisce questo processo che consiste nel reclutamento di vasi da quelli già esistenti e nell'incorporazione di progenitori endoteliali nel letto vascolare nascente. Si tratta di un fenomeno il quale si compie attraverso lo sviluppo di numerose fasi così costituite: digestione della membrana basale ad opera di proteasi, migrazione delle cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione dei nuovi vasi, proliferazione e differenziazione dell'endotelio, secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali che richiamano a sua volta cellule muscolari lisce e periciti per costruire la membrana basale, maturazione di queste per la formazione della rete vascolare nascente e loro successiva regressione. A ciascun step partecipa una grande varietà di enzimi, citochine e recettori pro ed anti-angiogenetici, alcuni (come VEGF) altamente specifici per le cellule endoteliali, altri (ad esempio FGF), con azione a più largo spettro. Nell'ambito di questi eventi, il legame di VEGF al suo recettore, VEGFR, risulta essere di fondamentale importanza in quanto garantisce la sopravvivenza delle cellule endoteliali, ne determina la mitogenesi, la migrazione e la differenziazione inducendo inoltre la mobilizzazione delle cellule progenitrici endoteliali (EPCs) dal midollo osseo al circolo periferico [113]. Il VEGF è un potente mitogeno (ED 50,2-10 pm) per le cellule endoteliali micro e macrovascolari derivate da vene, arterie e strutture linfatiche espresso in numerose neoplasie e viene secreto principalmente dalle cellule tumorali ipossiche e dai macrofagi. La famiglia dei geni legati al VEGF comprende otto glicoproteine: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PlGF-1 (*Placent Growth Factor 1*) e PGF-2. Esse non sono implicate solo nel processo angiogenetico, ma alcune di esse anche nella linfoangiogenesi.

Il VEGF fu introdotto nel 1983 da Dvorak e coll. ritenendolo fattore di permeabilità vascolare secreto dalle cellule tumorali. Successivamente Ferrara e coll. isolarono VEGF-A e ne descrissero l'attività mitogena. E' costituito da una glicoproteina omodimerica di 45 kDa e funge da ligando dei recettori tirosin-chinasici VEGFR-1, VEGFR-2, legandosi anche alle componenti della famiglia delle Neuropiline. Il VEGF-A esiste in diverse forme con numero di amminoacidi variabile da 121 a 206 (VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206); la maggiore di tali isoforme, VEGF 165, viene secretata liberamente, mentre le altre vengono sequestrate nella matrice extracellulare e necessitano dell'azione di alcune proteasi per essere attivate [114]. Diversi stimoli possono comportare un diffuso rilascio di varie isoforme di VEGF (VEGF 165 e VEGF 121) da diversi tipi di cellule. Queste proteine possono determinare una complessa serie di effetti sull'endotelio vascolare, incluso la crescita cellulare, la stimolazione della collagenasi interstiziale o la fuoriuscita vascolare di proteine plasmatiche. Le cellule tumorali stimolano le cellule endoteliali quiescenti a dividersi ed a formare nuovi vasi attraverso il rilascio di VEGF, il quale si lega al suo recettore globulinico transmembrana collocato nella vicinanza delle cellule endoteliali stesse, attraverso un dominio intracellulare tirosin-chinasico, attivando delle vie di segnale a valle, tra cui MEK-MAPK e PI3K-AKT. La famiglia dei recettori comprende VEGFR-1, VEGFR-2, coinvolto soprattutto nell'angiogenesi dei tumori solidi, VEGFR-3 e le neuropiline 1 e 2. Il legame del VEGF a tale recettore conduce conseguentemente ad una sua dimerizzazione, alla fosforilazione tirosin-chinasica, al reclutamento di segnali molecolari intracellulari responsabili della sopravvivenza, permeabilità vascolare, migrazione e proliferazione cellulare. Tale meccanismo attiva una serie di segnali a cascata che regolano gli eventi cellulari coinvolti nella formazione delle nuove strutture vasali, dal momento che i vari fattori di crescita della famiglia del VEGF possiedono differenti specificità di legame nei confronti di questi recettori. Fig.2

Le cellule endoteliali possono essere indotte attraverso tale meccanismo a dividersi in maniera esponenziale, raggiungendo in poco tempo un livello ottenibile, a condizioni normali, in anni di processi replicativi. Per mezzo dello switch angiogenetico, il tumore ottiene i nutrienti necessari per raggiungere il millimetro di diametro [115].

Nello specifico VEGF agisce sulla permeabilità vasale, in quanto i vasi preesistenti si dilatano in risposta all'ossido nitrico prodotto dall'ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS) come verrà illustrato successivamente. Tale fenomeno si traduce in un aumentato deposito di proteine, costituite principalmente da fibrinogeno, nello spazio

extracellulare. La successiva formazione di fibrina in tale compartimento ritarda a sua volta il riassorbimento dell'acqua libera normalmente presente: l'edema che ne consegue trasforma lo stroma normalmente inibitore dell'angiogenesi in pro-angiogenetico.

Un'ulteriore conseguenza dell'aumentata permeabilità consiste nell'innalzamento della pressione interstiziale, che inverte i gradienti pressori normalmente presenti nel tessuto ed in definitiva impedisce la penetrazione molecolare, come i chemioterapici anche se l'esatto meccanismo con cui il VEGF aumenti la permeabilità endoteliale non è noto.

In vitro il VEGF è capace di inibire l'apoptosi delle cellule endoteliali attraverso l'attivazione delle PI3K-AKT, comportando così una up-regulation di proteine anti-apoptotiche come bcl-2 ed A1. In vivo, sia nei tessuti sani (come i vasi retinici) che nello stroma tumorale, il VEGF preserva dalla distruzione i vasi immaturi privi del sostegno dei periciti; così come nella retina il letto vascolare maturo non subisce l'azione della molecola, similmente nel tessuto neoplastico sono solo i vasi neoformati e non quelli normalmente presenti a dipendere da VEGF. Pare che il sostegno dei periciti giochi un ruolo fondamentale in questa perdita di sensibilità da parte di quest'ultimi.

Una fase essenziale del processo angiogenetico è costituita dalla degradazione della membrana basale, in quanto senza di essa non potrebbe avvenire la migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali. Il VEGF induce la formazione di enzimi implicati in tali procedimenti come metalloproteinasi, collagenasi, uPA(urokinase-type plasminogen activator) e TTPA(tissue-type plasminogen activator). Al momento non è dato conoscere i meccanismi intracellulari attraverso i quali VEGF favorisce la migrazione cellulare, ma sembra che la chinasi FAK giochi un ruolo importante nel processo di adesione intracellulare, a cui sembra intervenire sinergicamente anche l'ossido nitrico[116].

L'ipossia rappresenta, infine, uno degli stimoli principali per la sintesi di VEGF ed il suo effetto sulla regolazione del fattore di crescita dell'endotelio vasale è mediato, a sua volta, dal fattore di trascrizione HIF(*Hypoxia-Inducible transcription Factor*): in presenza di una ridotta tensione di ossigeno le subunità che lo compongono, HIF-1 α e HIF-2 α (noto anche come EPsA1) interagiscono con la proteina nucleare HIF-1 β a formare un eterodimero $\alpha\beta$ che, legandosi ad una specifica sequenza della regione 5' del gene VEGF, denominato HRE(*Hypoxia Response Element*), ne stimola la trascrizione [117]

Alla luce di queste acquisizioni, negli ultimi anni, sono stati messi a punto agenti in grado di inibire il processo angiogenetico patologico, aventi come target sia VEGF che il suo recettore, con la funzione di agire indirettamente sulle cellule tumorali, bloccandone cioè

il conseguente sviluppo neoplastico agendo sulle cellule coadiuvanti il processo di neoformazione vasale. Questo ha fornito il razionale, per la conduzione di studi clinici, riguardanti l'impiego di farmaci a bersaglio molecolare atti ad inibire i promotori del processo angiogenetico nell'ambito di molteplici patologie, fra cui il tumore della mammella (Fig.1).

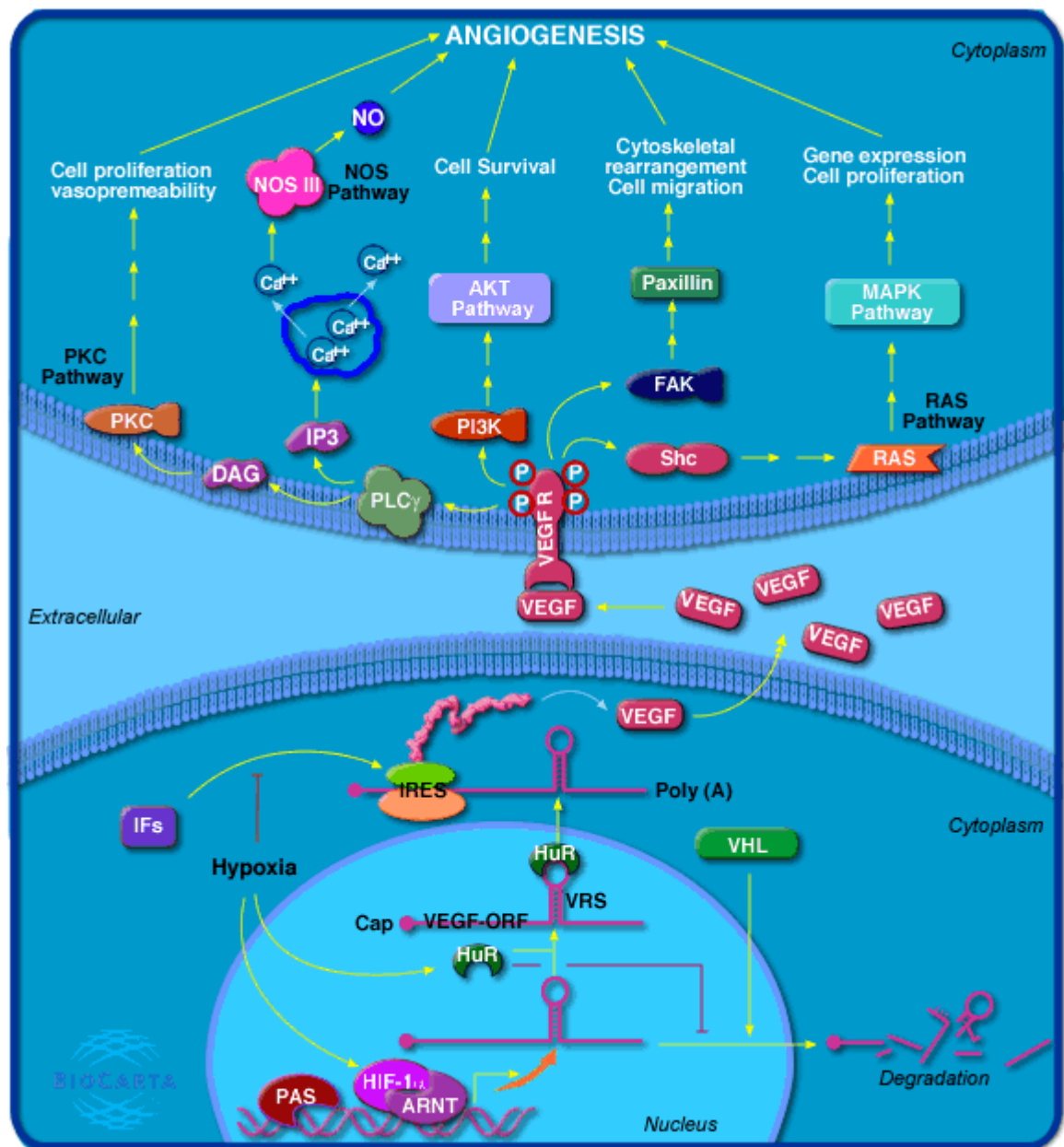


Figura 1-Meccanismi molecolari della neoangiogenesi

Jain RK. Nat Med. 2001;7(9):978-9.

Sono stati creati diversi anticorpi monoclonali murini, usando come immunogeno l'isoforma amminoacidica 165 del VEGF ricombinante umano. Tra questi l'anticorpo monoclonale diretto contro tutte le isoforme di VEGF-A, Bevacizumab, derivato dall'anticorpo murino A.4.6.1, si è dimostrato capace di neutralizzare in modo consistente l'attività biologica del corrispettivo umano, comportando una riduzione dell'attività

mitogena delle cellule endoteliali, della permeabilità vascolare e delle proprietà angiogenetiche a livello della membrana del corion [118].

Il Bevacizumab è, dunque, un anticorpo monoclonale umano anti VEGF costituito per il 93% da frammenti di IgG umane, che sono fondamentali per limitarne l'immunogenicità e per incrementarne l'emivita ma per il 7% è formato da regioni di derivazione murina che contengono il sito di legame per l'antigene. Tale farmaco ha un peso molecolare di 149 kDa e lega indifferentemente le 4 isoforme di VEGF-A, riconoscendo una sequenza di aminoacidi posizionati all'interno del B-turn dell'ansa sporgente B5-B6. Così neutralizzato, il VEGF non si lega ai suoi recettori, posizionati per lo più sulla superficie delle cellule endoteliali e non li attiva, inibendo perciò l'angiogenesi basale. I vasi tumorali si presentano come formazioni immature delimitate da una sottile membrana, con un ridotto numero di giunzioni intercellulari e dotate di elevata permeabilità, presentando numerose strutture vasali e a fondo cieco. L'effetto acuto o precoce del Bevacizumab è quello di sfrontare e far regredire i vasi tumorali più aberranti e questo effetto si realizza anche attraverso l'apoptosi delle cellule endoteliali venendo a mancare il meccanismo di pro-sopravvivenza che il VEGF esercita sulle cellule stesse. Il farmaco, infine, riduce la normalizzazione dei rimanenti vasi del tumore, risultando una vascolarizzazione più ordinata e simile a quella normale (Fig.2). Il diametro, la densità, e la permeabilità dei vasi tumorali si riducono, facendo abbassare la pressione interstiziale all'interno del tumore che si abbassa migliorando così il rilascio di agenti citotossici a livello del tumore. L'utilizzo cronico prolungato porta inoltre all'inibizione della formazione di nuovi vasi. E' stato osservato, però, che già dopo 3 settimane dalla sospensione del trattamento anti VEGF ci sia una ripresa della crescita a livello del letto vascolare della neoplasia

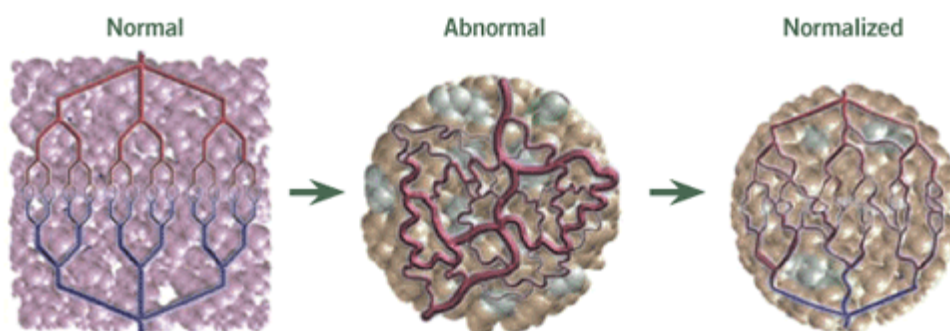


Figura 2- Azione degli inibitori di VEGF a livello della rete vascolare neoplastica
Ferrara N.Nat Med.2003; 9:669-676.

Similmente alle altre IgG, il Bevacizumab è caratterizzato da una lenta clearance (0,231l/die) che dipende dal peso corporeo, dal sesso e dallo stadio della patologia trattata anche se questa variabilità, tuttavia, non sembra associata a differenze nell'efficacia del trattamento. L'emivita iniziale è di 1,4 giorni mentre quella terminale (di eliminazione) è di circa 20; questo valore è in linea con quello delle IgG umane endogene e non sembra modificarsi nei regimi terapeutici di associazione con altri agenti chemioterapici. Dopo somministrazioni settimanali la concentrazione del farmaco aumenta, ma il profilo cinetico non si modifica e la distribuzione del farmaco al di fuori del circolo ematico risultante è molto bassa. Già nel 1992 in uno studio condotta da Kim e coll., aveva dimostrato che il farmaco aveva la capacità di neutralizzare l'attività biologica del VEGF, limitando in tal modo il potere mitogeno delle cellule endoteliali vascolari e condizionando la permeabilità vasale. Lo stesso studio aveva dimostrato che bevacizumab non interagiva con gli altri fattori di crescita testati (bFGF, EGF, PDGF)[118]. Tuttavia l'attività antiangiogenetica di tali terapie biologiche, capaci di bloccare la crescita tumorale, può essere incrementata dall'associazione con la chemioterapia in quanto a lungo andare le cellule tumorali acquisiscono resistenza al trattamento antitumorale o per fenomeni di mutazioni cellulari o a causa di modificazioni epigenetiche a carico delle cellule dell'endotelio. La terapia antiangiogenetica, potrebbe, dunque, rendere le cellule endoteliali più sensibili alla chemioterapia. Si tratta del razionale che recenti studi hanno utilizzato per giustificare l'ormai acquisita associazione delle due tipologie di trattamento. In diversi modelli preclinici il Bevacizumab ha dimostrato efficacia aggiunto alla chemioterapia in diversi tipi di neoplasie tra cui il carcinoma della mammella. Nel tumore della mammella, l'incremento dell'espressione del VEGF è stata associata ad una scarsa prognosi, comportando una riduzione della sopravvivenza libera da malattia e della sopravvivenza globale. Queste osservazioni suggeriscono che l'inibizione del VEGF costituisca un razionale approccio terapeutico per il trattamento del carcinoma mammario [119]. I principali meccanismi d'azione del BEVA possono quindi essere così riassunti: regressione dell'esistente microvascolatura tumorale, normalizzazione dei vasi tumorali maturi (effetto precoce) e inibizione della ricrescita vascolare e della neovascolarizzazione (effetto prolungato) in seguito ad un trattamento continuativo. Numerosi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia di Bevacizumab in associazione a chemioterapia nel trattamento di prima linea del

carcinoma mammario metastatico, portando all'approvazione del farmaco per il trattamento della malattia metastatica HER2 negativa. Sulla base dei soddisfacenti risultati preclinici [120] la sperimentazione del Bevacizumab nel carcinoma mammario metastatico è iniziata diversi anni fa con studi di fase I/II in donne affette da tale patologia, precedentemente pretrattate. Lo studio in questione, chiamato AVF0776g, ha dimostrato una certa efficacia dell'anticorpo monoclonale nel controllo della malattia con effetti collaterali attesi. Nel trial veniva valutata la somministrazione di bevacizumab con dose escalation rispettivamente di 3, 10, o 20 mg/kg ogni due settimane in 75 donne che erano ricadute dopo una chemioterapia convenzionale per malattia metastatica. I dati derivanti da una media di valutazione dei tre bracci di trattamento evidenziavano una ORR pari al 6,7% (il 16% delle pazienti aveva ottenuto almeno una stabilità di malattia a 22 settimane di terapia), con una OS di circa 10.2 mesi. Fu registrata la comparsa di cefalea, nausea e vomito in quattro pazienti trattate con una dose di 20 mg/kg, considerata, dunque dose-limitante. Tuttavia, il Bevacizumab fu ben tollerato se si escludono alcuni eventi associati a questo agente quali: ipertensione arteriosa (23%), sanguinamenti minori (epistassi nel 25.3%), fenomeni di tromboembolismo venoso (4%), comparsa di proteinuria senza alcuna evidenza di disfunzione renale (24%). Prendendo in considerazione i risultati relativi ai tre bracci di trattamento si stabilì che la dose di Bevacizumab pari a 10 mg/kg fosse il miglior razionale terapeutico in una popolazione di pazienti precedentemente pretrattate (media di due precedenti regimi per malattia metastatica)[121]. Il Bevacizumab è stato in seguito valutato in due studi clinici di fase III del carcinoma mammario metastatico: l'AVF2119g e l'E2100. Il primo di questi trials, condotta da Miller e coll., randomizzava 462 pazienti precedentemente trattate per malattia metastatica con antracicline e taxani a ricevere capecitabina (1250mg/mq bid giorno 1 e 14, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) in aggiunta o meno a bevacizumab (15mg/kg al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 settimane). L'end point primario dello studio era stato stabilito in termini PFS, mentre gli obiettivi secondari venivano rappresentati da ORR e dalla OS. Si evidenziò un significativo incremento di ORR nel braccio trattato con capecitabina e l'anticorpo monoclonale rispetto alla sola capecitabina (19.8% vs 9.1%; $p=0,001$). Tuttavia lo studio non riportò differenze statisticamente significative in termini di PFS (4.86 mesi vs 4.17 mesi; $HR=0.98$; 95% CI 0.77-1.25) e di OS (15.1 mesi vs 14.5 mesi); inoltre la combinazione della fluoropirimidina orale con il bevacizumab risultò, comunque, ben tollerata non registrando un incremento significativo della frequenza o

della severità degli eventi avversi correlati all' associazione dei due farmaci, tranne una maggiore incidenza di ipertensione di grado 3°4 secondo la scala di NCI (17.9% vs 0.5% del braccio riguardante la sola capecitabina)[122]. In conclusione l' AVF2119g non riuscì a dimostrare un miglioramento in termini di PFS, obiettivo primario, nonostante le buone risposte ottenute dal regime associativo. Diverse possono essere le ragioni a tal riguardo, quali per esempio, l'ipotesi che l'inibizione del VEGF è più efficace nella malattia in una fase iniziale piuttosto che in un setting metastatico o localmente avanzato, dove altri fattori proangiogenetici risultano overespressi. [123] Del resto, si deve tenere in considerazione che le pazienti arruolate erano state pretrattate, avendo ricevuto regimi contenenti antracicline e taxani prima di essere inserite nello studio. I risultati di questo studio suggeriscono, dunque, che il tempo ottimale per iniziare una terapia antiangiogenetica dovrebbe essere anticipato in una fase più precoce della storia clinico-patologica di una paziente: con la progressione della malattia, infatti si attivano ulteriormente numerose vie proangiogenetiche che rendono più labili le risposte ottenute e, di conseguenza, questo non permetterebbe il prolungamento della PFS. Nel secondo studio di fase III multicentrico randomizzato, chiamato E2100 (gruppo ECOG), 722 pazienti non pretrattate venivano randomizzate a ricevere il solo paclitaxel (90 mg/mq al giorno 1,8 e 15 con cicli ripetuti ogni 28 giorni) o l'associazione di tale farmaco con bevacizumab (rispettivamente 10mg/kg al giorno 1 e 15 e 90 mg/mq al giorno 1,8 e 15 con cicli ripetuti ogni 28 giorni). Le pazienti inserite nello studio presentavano una malattia localmente avanzata o metastatica HER2 negative o precedentemente trattate con Herceptin in caso di positività della proteina in questione, una buona performance status e, a livello laboratoristico basale, un accettabile profilo epatorenale (erano escluse la pazienti con proteinuria > 500/mg/DL/24h) ed assenza di metastasi cerebrali. Lo studio era disegnato con l'intento di ottenere un miglioramento medio di due mesi in termini di PFS. I risultati preliminari hanno dimostrato un significativo incremento nella PFS mediana nelle pazienti, end point primario, che avevano ricevuto il Bevacizumab con il chemioterapico rispetto al solo Paclitaxel (11.8 mesi vs 5.9 mesi $p<0,0001$), mentre ORR si era dimostrato a favore della combinazione con l'anticorpo monoclonale(36.9% vs21.1%; $p<0,001$)in assenza di un vantaggio significativo in termini di OS (26.5 mesi vs 2 .8 mesi; $p=.16$). In particolare nelle pazienti con sola malattia misurabile, le risposte risultavano del 49.2 % nella combinazione contro il 25.2% del solo Paclitaxel. Per quanto riguarda il profilo di sicurezza non si sono registrate differenze significative se si esclude

il riscontro di una maggiore incidenza di eventi correlati all'ipertensione (13.5% vs 0%), alla proteinuria di grado 3 e 4 (2.5% vs 0%; $p<0.001$) ed alla neuropatia di grado 3 e 4 (20,2% vs 14,2%; $p=0.03$) nel braccio di combinazione [124]. Ora sulla base dei risultati osservati in questi due studi di fase III, risulta evidente come il trial E2100 abbia raggiunto positivamente l'end point (PFS) oltre alle soddisfacenti risposte cliniche. Sembra naturale sottolineare come tali dati siano ascrivibili al fatto che le pazienti inserite in tale studio fossero comunque non precedentemente trattate per la metastasi (a differenza del trial AVF2119) e, cosa di non minor importanza, come le pazienti in esame presentassero dei fattori biologici prognosticamente più favorevoli (maggiore positività dell'assetto recettoriale e scarsa overespressività della proteina HER2). Sulla base di questi risultati, l'associazione di paclitaxel e bevacizumab è divenuta uno dei maggiori standard di riferimento per il trattamento di prima linea delle pazienti con tumore della mammella metastatico HER2 negativo. Questi risultati sono stati confermati nel successivo studio AVADO, studio multicentrico, randomizzato, di fase III, in doppio cieco, condotto su 736 pazienti randomizzate a ricevere Bevacizumab a due differenti dosaggi (7.5 mg/kg o 15 mg/kg al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) e docetaxel (100 mg/mq al giorno 1, con cicli ripetuti ogni 21 giorni) rispetto al taxano in associazione a placebo per un massimo di nove cicli. Entrambi i dosaggi di Bevacizumab in combinazione con chemioterapia hanno dimostrato un incremento significativo in termini d'efficacia rispetto a docetaxel da solo, sebbene tali differenze fossero inferiori a quelle osservate nello studio E2100. In particolare il tasso di risposte obiettive è stato 63% nel braccio bevacizumab 15 mg/kg, 55% nel braccio bevacizumab 7.5 mg/kg ($p=0.07$) e 46% nel braccio con placebo. La PFSmediana, end point primario, è risultata di 8.8 mesi ($p<0.001$), 8.7 mesi ($p=0.045$) e 8 mesi, rispettivamente, mentre non vi sono state differenze significative in termini di OS[125]. Lo studio ATHENA, studio non comparativo multicentrico, è stato disegnato con l'obiettivo primario di valutare il profilo di sicurezza di bevacizumab quando associato a taxani come prima linea di trattamento del carcinoma mammario metastatico o localmente ricorrente. L' anticorpo monoclonale è stato somministrato alla dose di 10 mg/kg ogni 2 settimane o 15 mg/kg ogni 3 settimane fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile in associazione a taxano, a discrezione dello sperimentatore condotto su 2027 pazienti. Eventi avversi severi si sono manifestati nel 28% dei pazienti, in particolare quelli più frequenti sono stati: neutropenia febbrile (5%), neutropenia (2.2%) e febbre (1.6%). I risultati di questo studio

suggeriscono inoltre come il proseguimento del bevacizumab fino a progressione, una volta interrotto il trattamento chemioterapico, possa avere un impatto positivo sul controllo di malattia a lungo termine e sulla sopravvivenza globale. Nell'intera popolazione la OS era di 25.2 mesi (95% CI 24.0-26.3 mesi), mentre questa risultava essere di 30.0 mesi (95% CI 28.5-32.7 mesi) nei pazienti che proseguivano un mantenimento con bevacizumab al momento dell'interruzione della chemioterapia (n=1205) e di 18.4 mesi (95% CI 17.2-19.7 mesi) nei pazienti che avevano sospeso il bevacizumab prima o al momento dell'interruzione della chemioterapia (n= 1058) [126].

Nello studio RIBBON-1, di fase III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, le pazienti con cancro della mammella metastatico arruolate (n=1273) sono state randomizzate a ricevere, con rapporto 2:1, Bevacizumab (15 mg/kg al giorno 1 ogni 21 giorni) associato a chemioterapia oppure placebo e chemioterapia, utilizzando come regime chemioterapico capecitabina oppure antracicline o taxano. Ad un follow-up di 15,6 mesi nella coorte capecitabina e 19,2 mesi nella coorte taxani e antracicline, l'aggiunta di bevacizumab ad un regime chemioterapico standard di prima linea ha portato ad un significativo aumento della PFS (end point primario dello studio): 8.6 mesi vs 5.7 mesi nel gruppo capecitabina (p 0.0002) e 9.2 mesi vs 8 mesi nel gruppo antraciclina o taxano (p<0.0001). Il profilo di tollerabilità di bevacizumab è simile a quello descritto nei precedenti studi di fase III [127]. Sono stati infine pubblicati i dati relativi ad uno studio di fase III randomizzato (RIBBON-2) che ha confrontato l'aggiunta di bevacizumab (alla dose di 15 mg/Kg ogni 21 giorni o 10 mg/Kg ogni 14giorni) ad una chemioterapia standard (a base di taxani o vinorelbina o gemcitabina o capecitabina) rispetto alla sola chemioterapia, come trattamento di seconda linea su 684 pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2 negativo, da cui è emerso un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS mediana di 7.2 mesi vs 5.1 mesi, p=0.0072) a favore della combinazione con bevacizumab [128]. Dai dati finora presentati appare evidente come la combinazione di taxani e bevacizumab sia in grado di incrementare la PFS ed il tasso di risposte obiettive rispetto alla monoterapia con taxani, antracicline o fluoropirimidine, nel trattamento di prima linea della malattia mammaria metastatica, con una tossicità maneggevole rispetto ad altri regimi di combinazione dei taxani con farmaci chemioterapici, costituisce quindi una valida opzione come strategia di associazione in questo setting di pazienti.

1.4 TOSSICITA' INDOTTA DA BEVACIZUMAB

Nonostante il trattamento con bevacizumab sia complessivamente ben tollerato, dagli studi clinici, che hanno incluso oltre 250.000 pazienti e dalla sorveglianza post marketing sono emersi alcuni eventi avversi specifici, prevalentemente correlati all'inibizione dell'angiogenesi e del VEGF. I più comuni effetti collaterali sono l'ipertensione arteriosa, la proteinuria, l'emorragia mucocutanea, generalmente di lieve o moderata gravità e di agevole gestione clinica. In corso di terapia con bevacizumab possono verificarsi anche alcuni eventi avversi gravi e più rari, come la perforazione gastrointestinale, gli eventi tromboembolici arteriosi e venosi, lo scompenso cardiaco congestizio, la perforazione del setto nasale e la sindrome della leucoencefalopatia reversibile posteriore, che devono essere monitorati attentamente e prontamente trattati e possono richiedere l'interruzione della terapia. Diversamente da quanto siamo abituati a fare con i farmaci chemioterapici, quando i pazienti sviluppano effetti collaterali dovuti al bevacizumab, il farmaco dovrebbe essere temporaneamente interrotto o discontinuato, piuttosto che somministrato a dose.

L'ipertensione arteriosa è il più comune evento avverso osservato nei pazienti che ricevono una terapia con tale farmaco. L'incidenza di ipertensione di qualsiasi grado in corso di terapia con bevacizumab è stata riportata nel 15-35% dei pazienti nei diversi studi clinici. In una recente metanalisi, che ha incluso 12.656 pazienti, condotta su 20 studi randomizzati, l'incidenza di ipertensione nei pazienti trattati con bevacizumab è stata del 23,6% con un 7,9% di ipertensione di grado 3-4 [129]. L'incidenza di ipertensione potrebbe tuttavia essere stata sottostimata negli studi clinici a causa delle differenti definizioni e classificazioni di ipertensione usate nei diversi trial e della scarsa frequenza con cui venivano effettuate le misurazioni della pressione arteriosa tra i pazienti ambulatoriali. Inoltre, solo recentemente il sistema per la definizione e classificazione della gravità degli eventi avversi da chemioterapia usato dal National Cancer Institute (NCI) è stato aggiornato in modo da riflettere più strettamente le nuove linee guida internazionali per la prevenzione, diagnosi e trattamento dell'ipertensione arteriosa[130]. Infine, i pazienti della popolazione generale potrebbero avere maggiori comorbidità rispetto ai pazienti altamente selezionati degli studi clinici e potrebbero avere pertanto un maggior rischio di sviluppare ipertensione in seguito alla terapia con bevacizumab. Tuttavia, l'esatto meccanismo patofisiologico dell'ipertensione indotta da bevacizumab

non è interamente conosciuto. L'inibizione del pathway del VEGF, come verrà spiegato in seguito, potrebbe portare ad una riduzione della sintesi di ossido nitrico e dell'attività delle prostacicline determinando un'alterazione della permeabilità vascolare, favorendo la vasocostrizione e portando ad un aumento delle resistenze periferiche e quindi della pressione arteriosa. Un altro meccanismo che potrebbe contribuire a spiegare la patogenesi dell'ipertensione indotta dal bevacizumab è la rarefazione, cioè la diminuzione della densità delle arteriole e dei capillari nei tessuti normali indotta dall'inibizione del VEGF. Infine potrebbe causare una disfunzione dell'endotelio delle arterie che può condurre ad un aumento della rigidità delle arterie[131, 132]. Seppure in assenza di dati da studi prospettici, alcuni aspetti riguardanti la prevenzione e il trattamento dell'ipertensione indotta dal bevacizumab dovrebbero essere enfatizzati. Il primo è la raccolta accurata dell'anamnesi patologica del paziente con attenzione alla storia familiare e personale di ipertensione arteriosa sistemica, patologie cardio e cerebrovascolari, diabete mellito, insufficienza renale cronica. Il secondo aspetto critico è quello di trattare in modo aggressivo l'ipertensione arteriosa prima di iniziare la terapia con bevacizumab. Secondo raccomandazioni del Joint National Committee for Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure il valore normale della pressione arteriosa dovrebbe essere <140/90 mmHg (<130/80 mmHg nel paziente con insufficienza renale) e questo dovrebbe essere il goal del trattamento antiipertensivo anche nei pazienti affetti da cancro prima e durante la terapia con bevacizumab. La comparsa di ipertensione arteriosa può avvenire in qualsiasi momento dopo l'inizio della terapia con bevacizumab e pertanto il monitoraggio della pressione arteriosa dovrebbe essere effettuato con frequenza settimanale o almeno prima di ogni somministrazione del farmaco (ogni 2-3 settimane) o anche giornaliera nei pazienti ad alto rischio (quelli con ipertensione preesistente o con altri fattori di rischio cardiovascolari). Poi dovrebbero essere incoraggiati cambiamenti dello stile di vita, inclusi la riduzione dell'assunzione di alcolici e cibi salati, l'astensione dal fumo di sigaretta e svolgere una modica attività fisica. Poiché la terapia con bevacizumab può indurre la comparsa di proteinuria, un esame delle urine dovrebbe essere eseguito prima di iniziare la terapia. La terapia antiipertensiva ottimale nei pazienti che ricevono bevacizumab non è stata definita e nella scelta della terapia antiipertensiva, dovrebbero essere considerati parecchi fattori, come la terapia farmacologica eventualmente in atto, la presenza o assenza di segni di danno agli organi bersaglio, le malattie concomitanti, il profilo di rischio del paziente, le preferenze

del paziente e del medico. Molti autori suggeriscono di iniziare come prima linea della terapia antipertensiva, in assenza di controindicazioni, un farmaco inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina poiché questi farmaci sono molto efficaci nel ridurre la pressione arteriosa e la proteinuria. Un'alternativa è rappresentata dai calcio-antagonisti (in particolare l'amlodipina o la felodipina) o dai beta-bloccanti [133]. Dopo l'avvio della terapia antipertensiva è raccomandato uno stretto monitoraggio clinico del paziente e nella maggior parte dei casi si riesce a gestire con successo l'ipertensione usando una o più classi di farmaci. Se i valori della pressione arteriosa non accennano a scendere sotto 165 mmHg di pressione sistolica e 100 mmHg di pressione diastolica, si consiglia di interrompere la terapia con bevacizumab, di modificare la dose o la classe di farmaco antipertensivo o di iniziare una terapia di combinazione e riprendere la terapia con bevacizumab solo in caso di normalizzazione dei valori di pressione arteriosa. Nei rari casi (<1%) di ipertensione di grado 3 refrattaria al trattamento antiipertensivo e di ipertensione di grado 4, la terapia con bevacizumab dovrebbe essere interrotta permanentemente[134].

La proteinuria è un evento avverso frequente nei pazienti che ricevono bevacizumab. Negli studi di fase II e III la proteinuria di ogni grado è stata osservata nel 21-35% dei pazienti. Generalmente la proteinuria è asintomatica, non è associata ad insufficienza renale e raramente richiede l'interruzione della terapia con l'anticorpo monoclonale. Casi di proteinuria di grado 3 o 4 (sindrome nefrosica) sono molto rari (<1%) [135]. Il meccanismo patogenetico della proteinuria non è ancora completamente chiarito. Il VEGF è probabilmente implicato nei processi di riparazione dell'endotelio glomerulare per cui l'inibizione del VEGF potrebbe interferire con l'integrità dell'endotelio glomerulare, determinare una microangiopatia trombotica e un difetto di filtrazione della barriera glomerulare renale e quindi proteinuria [136]. I pazienti dovrebbero eseguire un esame delle urine prima di iniziare la terapia con bevacizumab e poi ripeterlo prima di ogni somministrazione del farmaco. In caso di dipstick $\geq 2+$ dovrebbe essere misurata la proteinuria sulla raccolta di urine delle 24 ore e in caso di proteinuria $\geq 2\text{gr}/24$ ore si dovrebbe interrompere la terapia con bevacizumab fino alla riduzione del valore. In caso di segni e sintomi di sindrome nefrosica il trattamento dovrebbe comunque essere interrotto in maniera definitiva.

Emorragie minori, prevalentemente dalle superfici mucose come l'epistassi, sono un evento avverso comune, osservato nel 20-40% dei pazienti trattati con bevacizumab. Gli

eventi emorragici gravi sono rari, ma potenzialmente fatali e nei vari studi sono stati riportati in meno del 5% dei pazienti trattati con l'anticorpo monoclonale. Le emorragie severe possono verificarsi nella sede del tumore, come le emorragie polmonari nei pazienti con tumore del polmone o intestinali nei pazienti con carcinoma del colon-retto, oppure in sedi non coinvolte dal tumore, come le emorragie cerebrali in pazienti senza metastasi cerebrali [137]. In uno studio di fase II, condotto in pazienti affetti da tumore del polmone non-microcitoma che ricevevano bevacizumab in combinazione alla chemioterapia con carboplatino e paclitaxel, è stata riportata un'incidenza del 9% di emorragia polmonare grave o fatale. L'istologia squamosa e la localizzazione centrale del tumore sono state identificate come i principali fattori di rischio associati all'emorragia polmonare [138]. Il rischio di emorragia cerebrale potenzialmente fatale nei pazienti affetti da metastasi cerebrali non è noto poiché questi pazienti sono stati esclusi dalla maggior parte degli studi di fase II e III. Comunque, in uno studio di fase II in cui il bevacizumab veniva somministrato da solo o in combinazione con l'irinotecan in pazienti affetti da glioblastoma, l'incidenza di emorragia cerebrale di ogni grado è stata del 2,4% nel braccio con bevacizumab e del 3,8% nel braccio del bevacizumab più irinotecan, con un solo caso di emorragia cerebrale di grado ≥ 3 (1,3%) [139]. Sebbene il meccanismo responsabile delle emorragie osservate con il bevacizumab non sia chiaro, esso è probabilmente dovuto al ruolo svolto dal VEGF sull'endotelio normale dei vasi sanguigni. L'inibizione del VEGF potrebbe ridurre la capacità delle cellule endoteliali di rispondere ai danni indotti dai traumi e aumentare l'apoptosi delle cellule endoteliali, aumentando il rischio di sanguinamento. I pazienti che ricevono bevacizumab devono essere attentamente monitorati per il rischio di emorragia. La maggior parte degli eventi emorragici è di lieve entità (epistassi, gengivorragie) che generalmente si risolvono senza alcun trattamento specifico e non richiedono l'interruzione della terapia con bevacizumab. Nel caso di emorragie severe può essere necessario ricorrere a trasfusioni di sangue, a terapie di rianimazione, a manovre per il controllo del sanguinamento fino all'intervento chirurgico. In questi casi la terapia con bevacizumab deve essere interrotta [140]. Tale farmaco dovrebbe essere usato con cautela nei pazienti con coagulopatie congenite o acquisite note, mentre la presenza di piastrinopenia indotta dalla chemioterapia non sembra aumentare il rischio di emorragia. L'uso concomitante al trattamento con bevacizumab di una terapia anticoagulante o antiaggregante a dose profilattica non sembra aumentare il rischio di emorragie gravi, mentre i pazienti

sottoposti a una terapia anticoagulante o antiaggregante a dose terapeutica erano esclusi dagli studi clinici di fase III. Gli eventi tromboembolici che richiedono una terapia anticoagulante a dose terapeutica, sia con eparina a basso peso molecolare sia con warfarin, sono molto frequenti nei pazienti affetti da cancro e le complicanze emorragiche associate alla terapia anticoagulante sono più comuni in questo gruppo di pazienti. In un'analisi retrospettiva di tre studi randomizzati, placebo-controllati, che hanno coinvolto pazienti con tumore del colon-retto e del polmone, è stato analizzato il rischio di emorragia nei pazienti che avevano ricevuto una terapia anticoagulante a dose terapeutica per una complicanza tromboembolica venosa durante la terapia con bevacizumab. L'incidenza di emorragie gravi nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto terapia con quest'ultimo è stata simile rispetto a quella dei pazienti trattati con placebo (il rischio globale di emorragie gravi è stato rispettivamente del 4,1% con l'anticorpo monoclonale e 4,2% con placebo) [141].

Nei vari studi clinici l'incidenza di eventi tromboembolici venosi nei pazienti che ricevevano bevacizumab insieme alla chemioterapia è stata estremamente variabile e comunque simile a quella riportata nei pazienti che ricevevano solo la chemioterapia (2,8%-17,3% vs 3,2%-15,2%). Tuttavia, una recente metanalisi, che ha incluso i risultati di 15 studi randomizzati per un totale di 7956 pazienti, ha rilevato un'incidenza significativamente aumentata di eventi tromboembolici venosi di ogni grado nei pazienti trattati con bevacizumab rispetto ai pazienti che non lo avevano ricevuto (11,9% vs 6,3% rispettivamente), con un rischio relativo di tromboembolia venosa pari a 1,33 nei pazienti trattati con l'anticorpo monoclonale rispetto ai controlli ($p=0,001$). Però il rischio di incidenza di questo effetto collaterale sembra indipendente dalla dose di bevacizumab somministrata, anche se, nel caso di un evento grave di grado 3 o 4, la terapia dovrebbe essere interrotta per due settimane e poi ripresa proseguendo la terapia anticoagulante [142]. Inoltre, l'incidenza di eventi trombotici arteriosi, (ischemia cerebrale transitoria, ictus cerebrale, infarti del miocardio) appare aumentata nei pazienti trattati poiché, in un'analisi retrospettiva dei risultati di cinque studi randomizzati, che ha incluso 1745 pazienti con tumore metastatico del colon, della mammella e del polmone, è stata riportata un'incidenza di eventi trombotici arteriosi del 3,8% con bevacizumab più chemioterapia e dell'1,7% con chemioterapia da sola ($p=0.031$). La mortalità per eventi trombotici arteriosi è stata dello 0,62% nel gruppo dei pazienti trattati con bevacizumab e dello 0,26% nel gruppo della chemioterapia. In questa analisi sono risultati fattori di rischio

significativi per lo sviluppo di complicanze trombotiche arteriose nei pazienti che ricevono bevacizumab una storia di pregressi eventi trombotici arteriosi e un'età ≥ 65 anni [143]. Il VEGF svolge un ruolo essenziale nel mantenere l'integrità dei vasi sanguigni e nell'indurre l'espressione di fattori antiapoptotici. Pertanto l'inibizione del VEGF può causare una maggiore vulnerabilità dell'endotelio e la conseguente esposizione dei fosfolipidi subendoteliali che può scatenare la cascata della coagulazione; questi effetti possono essere aumentati da alcuni agenti chemioterapici. La durata della terapia con bevacizumab non sembra influenzare comunque l'incidenza di eventi trombotici come indicato nello studio osservazionale BRITe dove non è stata riportata una differenza statisticamente significativa nell'incidenza di eventi trombotici arteriosi nei pazienti che hanno ricevuto bevacizumab per un periodo < 12 mesi o ≥ 12 mesi (2,1% verso 0,7%) [144]. Nel caso di un evento trombotico arterioso di qualsiasi grado, il trattamento con bevacizumab dovrebbe essere interrotto definitivamente. Particolare attenzione deve essere riservata ai pazienti che dovrebbero ricevere terapia con bevacizumab e sono ad alto rischio di sviluppare eventi trombotici arteriosi, come i pazienti di età ≥ 65 anni e quelli con una storia di malattie cardiovascolari o cerebrovascolari. In questi casi l'efficacia della terapia antiaggregante o anticoagulante come profilassi degli eventi trombotici arteriosi deve essere ulteriormente indagata. L'uso profilattico di basse dosi di aspirina (< 325 mg/die) potrebbe essere considerato nei pazienti ad alto rischio, in assenza di controindicazioni [143].

Il VEGF è un mediatore essenziale di parecchi processi coinvolti nella riparazione tissutale e nella cicatrizzazione delle ferite. L'inibizione del VEGF blocca la crescita e la maturazione dei vasi sanguigni cruciali nel processo di cicatrizzazione. Gli effetti del bevacizumab sulla cicatrizzazione delle ferite in seguito ad un intervento chirurgico sono stati valutati in un'analisi retrospettiva degli studi di fase II e III nei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto. Nei pazienti sottoposti ad un intervento chirurgico, almeno 28 giorni ma non più di 60, prima di iniziare la terapia con bevacizumab non è stato evidenziato un aumento del rischio di complicanze nella cicatrizzazione delle ferite rispetto ai pazienti che avevano ricevuto solo la chemioterapia (0,5% con bevacizumab più chemioterapia verso 1,3% con chemioterapia; $p=0,63$). Invece, tra i pazienti sottoposti a chirurgia durante terapia con bevacizumab l'incidenza di complicanze delle ferite è stata maggiore rispetto a quella dei pazienti che ricevevano solo chemioterapia (13,3% bevacizumab più chemioterapia verso 3,4% della sola chemioterapia; $p=0,28$) [145]. Gli

incoraggianti risultati di questa analisi retrospettiva e di molti altri studi suggeriscono che bevacizumab può essere usato con sicurezza anche nel setting neoadiuvante e adiuvante. Per prevenire le complicanze postchirurgiche e della guarigione delle ferite è essenziale iniziare la terapia non prima di giorni dalla chirurgia e interrompere la terapia con bevacizumab almeno 8 settimane prima dell'intervento chirurgico anche se i risultati di uno studio più recente suggeriscono che sia sufficiente e sicura anche una sospensione della terapia di solo 5 settimane [146].

La perforazione gastrointestinale è un evento avverso raro e potenzialmente fatale nei pazienti che ricevono terapia con bevacizumab. L'incidenza di questo evento è stata riportata nel 2,6-2,8% delle pazienti con carcinoma dell'ovaio [147], è inferiore al 2% negli studi clinici randomizzati nei pazienti con carcinoma del colon-retto [148], mentre tra i pazienti affetti da carcinoma della mammella l'incidenza di perforazione intestinale è stata inferiore all'1%[124]. Il meccanismo patogenetico della perforazione intestinale non è completamente noto ed è probabilmente multifattoriale. La perforazione dell'intestino può verificarsi nella sede del tumore, ma anche in un tratto dell'intestino lontano dalla sede del tumore e può presentarsi, sia pure con minor frequenza, anche nei pazienti che non hanno localizzazioni neoplastiche nel colon-retto o nell'addome. I fattori di rischio che predispongono all'insorgenza di una perforazione intestinale in corso di terapia con bevacizumab non sono stati identificati con certezza, a causa anche del basso numero di eventi negli studi clinici. Alcuni autori hanno suggerito come fattori di rischio la presenza di: carcinosi peritoneale, di occlusione intestinale, un intervento di chirurgia sull'intestino nei due mesi precedenti, una recente colonscopia, una storia di malattia diverticolare del colon, ulcera peptica gastrica, ascesso intraddominale, la terapia cronica con corticosteroidi [148]. I pazienti trattati dovrebbero essere monitorati con attenzione per la comparsa di segni e sintomi precoci di perforazione gastrointestinale, quali vomito, stipsi e dolore addominale e dovrebbero essere prontamente trattati ma, nel caso di perforazione gastrointestinale, la terapia dovrebbe essere interrotto definitivamente.

La perforazione del setto nasale è una complicanza molto rara della terapia con bevacizumab. Il suo esatto meccanismo patogenetico non è chiaro; probabilmente il suo verificarsi è favorito dalla riduzione della vascolarizzazione della mucosa nasale indotta dall'inibizione dell'angiogenesi che determina la necrosi e la perforazione della cartilagine nasale. Una diagnosi rapida è importante e dovrebbe essere sospettata nel caso di comparsa di sintomi nasali quali: dolore, irritazione o congestione nasale, rinorrea,

epistassi e croste in un paziente sottoposto a terapia con bevacizumab. Nel sospetto di perforazione del setto nasale il paziente deve essere visitato dallo specialista otorinolaringoiatra e sottoposto ad una rinoscopia anteriore. Le perforazioni del setto nasale sono di solito autolimitanti e non richiedono l'interruzione della terapia. Ai pazienti si dovrebbe suggerire di evitare manipolazioni di eventuali lesioni e croste nasali, di evitare l'uso di spray nasali e l'inalazione di droghe[75].

Casi di scompenso cardiaco congestizio sono stati riportati solo occasionalmente come eventi avversi associati al bevacizumab nella maggior parte degli studi che hanno coinvolto pazienti affetti da carcinoma del colon-retto, del polmone, del rene e dell'ovaio. Recentemente sono stati pubblicati i risultati di una metanalisi di cinque studi randomizzati, controllati condotti con bevacizumab in pazienti affette da carcinoma metastatico della mammella. Tutti gli studi prevedevano un braccio di controllo, rappresentato in tre studi dal placebo e in due studi dalla chemioterapia. Un totale di 3784 pazienti sono state incluse in questa analisi; tutte le pazienti avevano ricevuto una precedente chemioterapia con antracicline mentre erano escluse da questi studi le donne con una storia di ipertensione non controllata, scompenso cardiaco congestizio, angina o infarto recente. I risultati della metanalisi hanno mostrato un aumento del rischio di scompenso cardiaco nelle donne trattate con l'anticorpo monoclonale rispetto a quelle del braccio di controllo o placebo, con un'incidenza globale di scompenso cardiaco dell'1,6% e dello 0,4% rispettivamente. Il rischio relativo di sviluppare tale evento avverso è stato circa 5 volte maggiore nelle pazienti trattate con bevacizumab rispetto a quelle che non avevano ricevuto bevacizumab ($p=0,001$)[149]. L'incidenza di scompenso cardiaco non sembra essere influenzata dalla dose di bevacizumab né dal tipo di chemioterapia concomitante somministrata. La patogenesi della cardiotossicità da bevacizumab è sconosciuta, ma probabilmente il meccanismo della sua insorgenza risiede nel fatto che l'anticorpo monoclonale, associato con un significativo incremento del rischio di ipertensivo. Questo provocherebbe uno stress ipertensivo che può risultare in un'ischemia dei miocardiociti. Il danno ischemico del miocardio può attivare diversi fattori proangiogenetici, tra cui il VEGF. Il VEGF è importante nella riparazione del danno del miocardio poiché determina vasodilatazione, stimola la proliferazione delle cellule endoteliali, mantiene la densità dei capillari nel miocardio e favorisce l'ipertrofia compensatoria del ventricolo sinistro. L'inibizione del VEGF da parte del bevacizumab potrebbe promuovere, in caso di un danno del miocardio da un precedente insulto, una

rapida evoluzione dall'ipertrofia compensatoria allo scompenso[150]. Alcuni autori suggeriscono inoltre che la cardiotossicità osservata con il bevacizumab sia reversibile dopo la sospensione della terapia. Ulteriori studi prospettici dovrebbero chiarire in maniera più rigorosa il potenziale rischio di scompenso cardiaco congestizio associato alla terapia con bevacizumab, il tempo d'insorgenza, l'evoluzione clinica e le reversibilità del danno miocardio e i fattori di rischio predisposti [151].

Infine, la sindrome della leucoencefalopatia reversibile posteriore è una rara sindrome neurologica, raramente associata alla terapia con bevacizumab. La presentazione clinica di questa sindrome è piuttosto complessa e caratterizzata dalla comparsa di segni e sintomi quali: cefalea, crisi comiziali, alterazione dello stato mentale, disturbi della vista, cecità corticale, con o senza ipertensione arteriosa e alterazioni sulla risonanza magnetica cerebrale, che è essenziale nel sospetto clinico di questa sindrome. La terapia comprende il controllo dell'ipertensione e l'interruzione della terapia con bevacizumab, che nei casi riportati ha determinato una rapida risoluzione dei sintomi. Non è chiaro se la terapia possa essere continuata dopo l'insorgenza della sindrome [152].

1.5 Ruolo dei polimorfismi genetici coinvolti nell'angiogenesi tumorale come biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità al bevacizumab

Come esposto precedentemente, Bevacizumab rappresenta ad oggi una delle opzioni terapeutiche maggiormente adottate nel trattamento di prima linea del tumore della mammella metastatico sulla scia del netto miglioramento in termini di PFS registrati nello studio E2100[124], dimostrandone quindi la sua efficacia e sicurezza grazie alla bassa incidenza e alla facile gestione di eventi avversi rilevati in merito al profilo di tossicità.. Tutto questo deve essere visto nel contesto di un dibattito generale, in quanto non per tutti i pazienti il trattamento in questione risulta essere di pari efficacia, a causa dello sviluppo di meccanismi di resistenza intrinseca o acquisita del farmaco, limitandone il beneficio clinico complessivo. La necessità di identificare e sviluppare marcatori prognostici e predittivi di risposta in grado di selezionare i soggetti maggiormente responsivi al regime terapeutico contenente bevacizumab, in considerazione anche degli elevati costi impiegati, risulta essere non solo una necessità clinica, la quale consentirebbe l'attuazione di un trattamento personalizzato, ma un'esigenza dal punto di vista economico permettendo così un impiego più razionale delle risorse. Ciò ha fornito il razionale per la conduzione di numerosi studi clinici, al fine di identificare biomarcatori predittivi di risposta al bevacizumab da implementare nella pratica clinica. Ad oggi nessun fattore predittivo di efficacia e resistenza è stato validato, in quanto la ricerca risulta essere difficoltosa per svariate motivazioni. In primis, il processo angiogenetico risulta essere complesso ed adattativo, nonostante il ruolo predominante di VEGF-A, molteplici altri fattori precedentemente citati (dal FGF, al PlGF: *Placental Growth Factor*, alle angiopoietine e citochine) giocano un ruolo fondamentale nel suo sviluppo. Poi un ulteriore elemento di criticità viene fornito da quei fattori che promuovono la degradazione proteolitica della matrice o inducono la maturazione del sistema vascolare stimolandone la copertura pericitica (PDGF-BB: *Platelet-Derived Growth Factor-BB*, ephrin-B2, NOTCH). Come risultato, l'attività di bevacizumab può essere compensata da una decina di segnali angiogenetici alternativi. In secondo luogo, studi preclinici hanno messo in luce che il blocco di VEGF-A produce molteplici effetti sullo sviluppo tumorale: dal blocco dell'espansione vasale e delle cellule progenitrici endoteliali, all'inibizione dei vasi preesistenti; sulla base di queste evidenze e dei risultati non conclusivi e discordanti delle

indagini condotte, un unico fattore potrebbe non essere sufficiente a predire l'efficacia e la tossicità ad un trattamento con bevacizumab da impiegare nella pratica clinica [153]. Molti studi hanno analizzato i fattori angiogenetici circolanti (CAFs: *Circulating Angiogenic Factors*), per predire l'outcome dei pazienti in trattamento con tale farmaco. Risultati discordanti, per quanto riguarda il tumore della mammella, erano precedentemente emersi nello studio condotto da Gasparini e coll., nel quale le pazienti affette da tale patologia e trattate con chemioterapia o sottoposte a terapia endocrina, presentavano una ridotta PFS nella casistica associata a bassi livelli plasmatici di VEGF[154] Attualmente si sta valutando la possibilità di considerare i cambiamenti in termini di espressione dei fattori angiogenetici circolanti durante il trattamento con bevacizumab, come fattore predittivo di resistenza alla terapia, ma anche in questo caso, i dati emersi sono risultati discordanti o non conclusivi.

Allo stesso modo, l'analisi delle cellule endoteliali circolanti (CECs: *Circulating Endothelial Cells*), potrebbe assumere un ruolo importante in termini di predittività. Quest'ultime mostrano un fenotipo maturo e risultano essere cellule apoptotiche derivate dalla parete endoteliale. A sua volta, una loro sottopopolazione, detta delle progenitrici endoteliali circolanti (CEPs), con attività proliferativa potenziale, sembra coinvolta nel processo angiogenetico guidato da VEGF-A, in quanto la loro mobilitazione è implicata nella formazione del letto vascolare. Il cambiamento del livello delle CEC promette di poter essere utilizzato in futuro come marker predittivo nella terapia con farmaci antiangiogenetici [155], ma, al momento, i dati preliminari risultano discordanti.

Diversi studi stanno valutando la correlazione fra i vari fattori implicati nel processo angiogenetico e le cellule stromali. In particolare, l'espressione di VEGF-A sulle cellule tumorali è stata analizzata tramite metodiche immunoistochimiche, di ibridazione in situ o real-time PCR (real-time polymerase chain reaction), anche se poche correlazioni hanno dato esito positivo. Sono stati inoltre esaminati ulteriori componenti implicate nell'angiogenesi tumorale, come il co-recettore neuropilina-1 (NRP1), i cui bassi livelli di espressione, analizzati in pazienti affette da tumore della mammella metastatico dello studio randomizzato di fase III AVF2119g, evidenziano un miglior beneficio in termini di PFS[156].

Dall'osservazione delle caratteristiche di eterogeneità della risposta al trattamento con bevacizumab, è stato ipotizzato che tale processo fosse determinato da una variabilità individuale determinata geneticamente. Da ciò si evince l'importanza dell'analisi dei

polimorfismi genetici correlati al processo di neoangiogenesi al fine di individuare biomarcatori prognostici e predittivi di efficacia al trattamento con tale farmaco. Il gene VEGF-A, localizzato in posizione 6p21.1 sul cromosoma 6, è infatti un gene altamente polimorfo di cui sono noti diversi polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) tra cui -2578 C>A, -1498 C>T e -1154 G>A nella regione promoter, il -634 G>C nella regione 5'UTR ed il 936 C>T nella regione 3'UTR. Queste alterazioni genetiche sono coinvolte nell'attività ed espressione di VEGF e quindi, presumibilmente anche nella variabilità individuale di risposta alla terapia antiangiogenetica. Alcuni lavori ipotizzano un ruolo predittivo di alcuni genotipi, come il polimorfismo -1498TT analizzato nello studio di Loupakis e coll., condotto su una popolazione di 111 pazienti con cancro del colon sottoposti a trattamento in prima linea con fluorouracile, acido folinico, irinotecano e bevacizumab (FOLFIRI-B) ed un gruppo controllo di 107 pazienti trattati con FOLFIRI [157]. Anche i risultati dei polimorfismi del VEGF-A ottenuti dall'analisi di Koutras e coll. su 209 pazienti trattati con FOLFIRI o XELIRI in associazione a bevacizumab, dimostrano che alcuni genotipi (-2578 AC e -1154 AG), siano correlati ad un miglioramento della OS [158], a differenza di altri lavori, come lo studio di fase II GONO, condotto da Loupakis e coll. riguardante 54 pazienti trattati con l'associazione di fluorouracile, acido folinico, oxaliplatino, irinotecano e bevacizumab (FOLFOXIRI-B) [159]. Lambrechts D e coll., in un'ampia analisi di polimorfismi, condotta su 1348 campioni di DNA germinale derivanti da 5 studi randomizzati sul trattamento di prima linea nella malattia avanzata, rispettivamente: colon rettale (NO16966 - XELOX ± bevacizumab vs FOLFOX ± bevacizumab), pancreatico (AVITA - gemcitabina e erlotinib ± bevacizumab), polmonare non a piccole cellule (AVAIL - cisplatino e gemcitabina ± bevacizumab), renale (AVOREN - IFN α -2a ± bevacizumab) e mammario (AVADO - docetaxel ± bevacizumab). Mediante spettrometria di massa MALDI-TOF sono stati genotipizzati 158 SNPs relativi a numerosi geni, tra cui VEGF-A, VEGFR-1 e 2 e i fattori inducibili dall'ipossia, HIF-1 e EPAS1; tramite una metanalisi dei dati individuali gli autori hanno quindi valutato le potenziali interazioni tra genotipo ed efficacia del bevacizumab. L'analisi mostra come le maggiori interazioni tra genotipo ed outcome siano relative ad alcuni polimorfismi di VEGFA, VEGFR-2 e EPAS1. In particolare è descritta un'associazione tra lo SNP rs699946, collocato nella regione promoter di VEGF-A, e la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con bevacizumab [HR allelico (allele G) 1.26, 95%CI 1.07-1.48, p=0.005] ma non nella

popolazione placebo, nonché un'associazione tra la variante allelica G di questo SNP e i livelli di VEGF plasmatici (aumento mediano del VEGF plasmatico del 27% nel genotipo GG rispetto ai genotipi AA (wild type) e GA), suggerendo anche un possibile significato funzionale di questo SNP. Gli autori non hanno invece evidenziato l'associazione tra il vicino polimorfismo rs699947 nella regione promoter di VEGF-A (-2578CA) e l'efficacia del bevacizumab. Inoltre dal lavoro è emersa un'associazione tra lo SNP intronico di VEGFR-2rs11133360 e la sopravvivenza libera da progressione nei pazienti trattati con l'anticorpo monoclonale [HR allelico (allele C) 1.15, 95% CI: 1.02–1.30; p=0.022] ma non con placebo, suggerendo un possibile significato predittivo di questa variante genetica. Infine l'associazione più forte tra genotipo ed outcome in quest'analisi è relativa ad un polimorfismo in EPAS1 (HIF-2 α), uno dei fattori inducibili dall'ipossia; in particolare la variante allelica A nello SNP rs4145836 in EPAS1 ha mostrato una significativa associazione con la sopravvivenza libera da progressione (HR allelica 0.66, 95% CI: 0.54–0.80; p=0.00003) e con la sopravvivenza globale (HR allelica 0.77, 95% CI: 0.62, 0.97; 0.023) nella popolazione trattata con bevacizumab, così come nei pazienti trattati con placebo, emergendo come un possibile biomarcatore prognostico.

In un altro lavoro Schultheis AM. e coll hanno analizzato in modo prospettico l'impatto di polimorfismi di numerosi geni implicati nella pathway angiogenetica, non direttamente legati al noto meccanismo di azione anti-VEGFA del bevacizumab, e la risposta ad un trattamento con ciclofosfamide (50 mg p.o. continuativamente) e bevacizumab (10mg/Kg e.v. ogni 14 giorni) sui campioni ematici di 53 pazienti con carcinoma ovario recidivato. L'analisi non ha evidenziato significative associazioni tra polimorfismi di VEGF e outcome, eccetto un trend di maggiore sopravvivenza libera da progressione nel genotipo -936CT rispetto ai genotipi CC e TT, rispettivamente di 11.8 mesi, 5.5 mesi e 3.2 mesi (p=0.061), descrivendo al contrario associazioni significative per varianti di alcuni geni coinvolti nell'angiogenesi e nella risposta immunitaria, come l'interleuchina-8 (IL-8) e il suo recettore CXCR2. In particolare gli autori descrivono un minor tasso di risposte obiettive nelle pazienti con genotipo IL-8 -251AA o AT (rispettivamente 0% e 19%) rispetto alle pazienti con genotipo omozigote TT (50%, p=0.006); inoltre è descritta una maggiore sopravvivenza libera da progressione nelle pazienti con genotipo CXCR2-785CC o CT (7.4 mesi) rispetto alle pazienti con genotipo omozigote TT (3.7 mesi, p=0.026[160]). Studi clinici suggeriscono come i meccanismi di feedback indotti dal trattamento con farmaci antiangiogenetici non siano ristretti alla sola espressione di

VEGF, ma coinvolgano anche altri mediatori dell'equilibrio angiogenetico, tra cui la TSP-1. In particolare i risultati di uno studio condotto da Brostjan C. e coll. in pazienti con diagnosi di carcinoma colon rettale trattati con un trattamento chemioterapico neoadiuvante in associazione o meno a bevacizumab, suggeriscono come la trombospodina-1 (TSP-1) sia coinvolta nei meccanismi di feedback indotti dal trattamento con farmaci antiangiogenetici. Dall'analisi dei campioni di plasma dei pazienti in studio è emerso come nei campioni dei pazienti trattati con bevacizumab rispetto a quelli trattati con la sola chemioterapia vi fosse una maggiore capacità di stimolare la crescita endoteliale, nonostante la presenza di bevacizumab, ed un minor livello e alterata sensibilità alla TSP-1. La capacità di stimolare la crescita endoteliale non risultava rallentata dal bevacizumab ma correlava in modo inverso con i livelli di trombospodina 1. Tramite l'aggiunta di TSP-1 purificata a questi campioni di plasma, la crescita endoteliale risultava ridotta nei campioni dei pazienti trattati con bevacizumab ma non in quelli che avevano ricevuto il solo trattamento chemioterapico [161].

Lo studio retrospettivo di Schneider e coll. ,il primo a suggerire un'associazione significativa tra genotipo di VEGF ed efficacia di bevacizumab, ha valutato l'influenza di alcuni SNPs di VEGF e VEGFR-2 sull'efficacia del trattamento con bevacizumab in 363 pazienti arruolati nello studio registrativo E2100 (180pazienti del braccio sperimentale e 183 pazienti del braccio di sola chemioterapia), per i quali erano disponibili i blocchetti paraffinati di tessuto tumorale. L'analisi genotipica è stata effettuata su alcuni SNPs di VEGFR [889G/A, 1416 A/T] e di VEGF [-2578C/A, -1498CT, -1154GA (nella regione promoter), -634 GC (nella regione 5'UTR) e 936CT (nella regione 3'UTR)], selezionati in base alla loro frequenza e capacità di alterare la funzione o espressione del gene in modo biologicamente rilevante, sul DNA estratto da campioni tissutali del tumore primitivo. Dai risultati emergeva come i genotipi VEGF-2578AA e - 1154AA fossero predittivi di una migliore sopravvivenza globale per le pazienti nel braccio di combinazione con bevacizumab, ma non per le pazienti trattate con la sola chemioterapia. In particolare gli autori descrivevano nel braccio sperimentale una maggiore sopravvivenza globale per il genotipo VEGF-2578AA rispetto agli altri genotipi combinati [mOS di 37.0 mesi nel genotipo 2578AA, 24.4 mesi nel genotipo AC e 22.2 mesi nel CC. AA vs AC+CC: HR 0.58, 95%CI 0.36-0.93; p=0.023] e per ciascun allele VEGF-1154A [HR 0.62, 95%CI 0.46-0.83, p=0.001. mOS di 46.5 mesi nel genotipo VEGF-1154AA, 29.8 mesi nel GA e 22.3 mesi nel GG].Confrontando i genotipi

combinati VEGF-2578AA e -1154AA con tutti gli altri genotipi, gli autori descrivevano un incremento della sopravvivenza a favore della suddetta combinazione genotipica ($P=0.041$) nel braccio sperimentale, con una sopravvivenza mediana di 49.7 mesi. Non emergeva alcun significativo impatto del genotipo sul RR e la PFS, così come tra genotipo ed espressione di VEGF e VEGFR-2 misurati sul tumore primitivo, con l'eccezione di un trend di minore espressione di VEGF nei genotipi associati ad una maggiore sopravvivenza. Inoltre gli autori descrivono un'associazione tra sviluppo di ipertensione arteriosa ed outcome, mostrando una sopravvivenza globale significativamente superiore per i pazienti con ipertensione di grado 3 e 4 rispetto ai pazienti che non sviluppavano ipertensione nello studio E2100 (rispettivamente 38.7 vs 35.3 mesi, $p=0.002$). Tuttavia per quanto riguarda l'analisi di associazione tra genotipo e sviluppo di tossicità correlata al bevacizumab, osservavano nei pazienti trattati con bevacizumab una minore incidenza di ipertensione di grado 3-4 nei genotipi VEGF-634CC e -1498TT (rispettivamente 0% nel -634CC e 8% nel -1498TT), rispetto agli altri genotipi combinati (rispettivamente, $p=0.005$ e $p=0.022$ [162]). Nello studio condotto da Etienne-Grimaldi e coll. gli autori hanno valutato l'associazione tra genotipo e sviluppo di tossicità, tramite un "toxicity score" definito dalla somma del massimo grado osservato di ciascuna tossicità correlata al bevacizumab (ipertensione, emorragie, trombo embolia arteriosa, trombo embolia venosa). Le tossicità osservate sono state soprattutto di grado 1-2, con rari eventi di grado 3 (9.5% di ipertensione, 13 pazienti, e 2.2% di eventi trombo embolici venosi, 3 pazienti) e di grado 4 (0.7% di eventi trombo embolici venosi e arteriosi (1 paziente), ed un toxicity score mediano di 1 (range da 0 a 6). L'analisi del polimorfismo -634GC ha mostrato come il 39%, 49% e 81% dei pazienti con genotipo, rispettivamente, -634GG, -634GC e -634CC avessero un toxicity score > 1 (valore mediano) ($p=0.012$), suggerendo una possibile associazione tra l'allele -634C e il rischio di sviluppare tossicità, a differenza di quanto emergeva dallo studio di Schneider in cui il genotipo -634CC si associava ad una minore incidenza di ipertensione arteriosa di grado 3 e 4. Infine Miles DW e coll. hanno condotto un'analisi di diversi polimorfismi di geni coinvolti nella pathway angiogenetica, infiammatoria, nello sviluppo di ipertensione arteriosa e tumorigenesi (tra cui VEGF, VEGFR-1 e 2, eNOS, WNK-1, IL8, IL-6, IL8-R, ICAM-1, p53, ERCC1) sul DNA germinale di 336 pazienti con carcinoma mammario metastatico trattate con docetaxel associato o meno a bevacizumab nello studio randomizzato AVADO, non evidenziando alcuna correlazione significativa tra

genotipo ed efficacia del bevacizumab, così come tra genotipo e livelli plasmatici di VEGF-A [162]. L'associazione fra eNOS ed ipertensione verrà illustrata in seguito.

1.6 eNOS

La parete arteriosa è strutturalmente e funzionalmente compartimentalizzata. La media, la quale rappresenta la sezione contenente le cellule muscolari lisce effettrici, riceve segnali centrifughi dall'endotelio e centripeti dai tessuti metabolicamente attivi, dalle terminazioni nervose avventiziali e dai peptidi rilasciati nell'interstizio. Il grado di contrazione o rilassamento delle cellule muscolari lisce vascolari caratterizza il tono vasomotore generale, che regola il livello di pressione sanguigna locale e distribuisce il flusso secondo le necessità metaboliche locali. Il principale agente fisiologico vasoattivo è rappresentato dall'ossido nitrico (NO) [163] prodotto dalla famiglia dell'ossido nitrico sintasi (NOSs) che è stata identificata per la prima volta nel 1989, mentre sono state clonate e purificate tra il 1991 al 1994 le sue maggiori isoforme, prodotte rispettivamente da tre geni distinti che hanno diverse localizzazioni, meccanismi regolatori, proprietà catalitiche e differenti sensibilità agli agenti inibitori. La prima ad essere stata scoperta, il cui gene è situato sul cromosoma 12, nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*), nota anche come NOS-1, è sintetizzata a livello neuronale. La seconda iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) o NOS-2, individuata inizialmente in linee cellulari macrofagiche attivate, con localizzazione a livello del cromosoma 17, rappresenta l'isoforma inducibile in una vasta gamma di cellule, come cardiomiociti, cellule gliali o cellule muscolari lisce. Infine, la terza tipologia dell'enzima è rappresentata da eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), conosciuta anche come NOS3, studiata per la prima volta nel sistema vascolare ma identificata anche a livello dell'ippocampo, dei cardiomiociti e delle piastrine, il cui gene si trova a livello del braccio lungo del cromosoma 7 (7q35-7q36). Tutte le isoforme di NOSs sono costituzionalmente formate da una struttura dimerica con dominio ossigenasico contenente eme e un dominio reduttasico, che è connesso al precedente per mezzo della regione di riconoscimento della calmodulina. Per l'espletamento della funzione enzimatica le NOSs richiedono l'intervento di numerosi cofattori e gruppi prostetici; infatti, la regione ossigenasica contiene siti di legame per l'eme, per la tetraidrobiopetrina (BH₄) e per la L-arginina, mentre la regione reduttasica prevede l'interazione con NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide), FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) ed FMN (Flavin Mononucleotide), il cui flusso di elettroni consente la successiva riduzione del ferro contenuto nel gruppo eme. La NOS sintetizza NO attraverso l'ossidazione di L-arginina in L-citrullina con un meccanismo

Ca⁺⁺/calmodulina- dipendente [164]. La comprensione del suo meccanismo d'azione è stata avvalorata anche dalla recente scoperta che, sia negli organismi invertebrati che nei vertebrati, alcuni precursori organici come l'arginina e l'eme, sono trasformati enzimaticamente in piccole molecole inorganiche, come CO oppure NO, le quali hanno la capacità di svolgere la funzione di segnale [165]. Entrambe hanno la caratteristica di essere dei gas diffusibili, incapaci di interazione con uno specifico sistema recettoriale, ma, l'elevata reattività di NO, pur essendo potenzialmente tossico, lo vede coinvolto in una vasta gamma di processi fisiologici, tra cui la neurotrasmissione, la regolazione sia del sistema immunitario che di quello cardiovascolare, nonché il rilasciamento della muscolatura involontaria e l'aggregazione piastrinica [166]-168].

Di particolare rilevanza risulta essere il ruolo svolto da NO prodotto a livello endoteliale da eNOS, in quanto viene considerato il più importante vasodilatatore endogeno [167]-[168]. In condizioni fisiologiche, nella cellula endoteliale, l'attivazione di eNOS si concretizza in risposta a stimoli di varia natura, come ad esempio quelli di tipo meccanico (shear stress), recettore-mediati (acetilcolina) o indipendenti da stimoli recettoriali (ionoforo del calcio); tale meccanismo provoca la diffusione di NO negli spazi interstiziali verso le cellule della muscolatura liscia vasale con conseguente attivazione della guanilato ciclasi solubile (GCs). E' noto che tale proteina eterodimerica, formata da due subunità (α e β), presenta lo stesso gruppo eme (protoporfirina IX) dell'emoglobina, capace di legare concentrazioni di NO anche molto basse (5-10 nM) e permettendo la formazione di un complesso Fe-NO nei tessuti preposti. La formazione di quest'ultimo induce quindi un cambiamento conformazionale dell'enzimale da attivarlo e portarlo all'accumulo della guanosina 3'5' monofosfato (GMPc), in grado di stimolare la protein-chinasi G (PKG) ed i canali ionici GMPc-dipendenti, coinvolti nel processo di rilassamento della muscolatura endoteliale, con conseguente vasodilatazione [169].

In considerazione del ruolo essenziale svolto da eNOS e quindi dalla conseguente produzione di NO sulla funzione e regolazione del tono vasale, sono state analizzate le implicazioni di tale meccanismo nella patogenesi di svariate malattie come le alterazioni che colpiscono l'apparato cardiovascolare o la nefropatia diabetica. Sulla base di queste osservazioni e dell'importanza della variabilità individuale geneticamente determinata nello sviluppo di queste patologie, sono stati identificati diversi polimorfismi del gene eNOS, in particolare 894G>T localizzato sull'esone 7, in grado di modificare la sequenza del suo codone (Glu298>Asp). Questa variante sembra indurre un cambiamento

conformazionale dell'enzima eNOS che ne riduce l'attività determinando l'insorgenza di: vasocostrizione in risposta all'azione delle felinefrine e dell'innalzamento della pressione sanguigna, con il conseguente aumento dell'incidenza di eventi cardiovascolari quali coronaropatie o infarto del miocardio. Nello studio condotto da Hingorani e coll., è stata analizzata la correlazione fra il polimorfismo a singolo nucleotide rs1799983(894G>T) e la malattia aterosclerotica coronarica(CAD) in particolari soggetti, con diagnosi di coronaropatie diagnosticata per via angiografica o recente infarto del miocardio, inclusi in due studi caso-controllo indipendenti. Dai risultati è emersa una maggiore frequenza dei soggetti omozigoti eNOS 894TT rispetto ai controlli sia per quelli con diagnosi di coronaropatia (35.9% vs 10.2%; $p<0.0001$) che per i pazienti con storia clinica di recente infarto del miocardio (18.1% vs 8.7%; $p<0.02$) [170]. Successivamente è stato indagato anche il polimorfismo a singolo nucleotide della regione 5'UTR, rs2070744 (-786T>C), con lo sviluppo di stenosi aterosclerotica severa carotidea, evidenziando che l'omozigosi della variante allelica -786C ($p=0.018$) sembra essere un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo della stenosi di natura aterosclerotica della carotide interna [171] anche se l'influenza di queste due varianti genetiche nelle fasi iniziali dell'aterogenesi non è stata del tutto chiarita. Nello studio condotto da Nagase e coll. è stato messo in relazione le variabili genetiche di eNOS con il deterioramento della funzione renale in soggetti con diagnosi di ERSD(end-stage renal disease) nell'ambito della nefropatia diabetica, in quanto NO è considerato un forte regolatore dell'emodinamica intrarenale. Questo lavoro mette in luce come vari polimorfismi di eNOS, mediante alterazione dell'attività trascrizionale o post-trascrizionale del gene, possono influenzare la progressione della malattia renale mediante una diminuita produzione di NO [172]. Il ruolo nefroprotettivo dell'enzima è anche suggerito da recenti osservazioni in nuovi modelli sperimentali di nefropatia diabetica. In uno studio condotto sui topi knockout per eNOS, è stato evidenziato un peggiore outcome clinico nell'ambito della patologia renale, con maggiore aumento dell'albuminuria e della riduzione del filtrato glomerulare, ipotizzando che la predisposizione alla nefropatia diabetica da inibizione di tale enzima potrebbe essere legata ad un disaccoppiamento dell'asse NO/VEGF, caratterizzato da aumentata espressione di quest'ultimo con conseguente proliferazione delle cellule endoteliali VEGF-indotta[173].

La correlazione esistente fra eNOS e VEGF risiede nel ruolo svolto da quest'ultimo nell'angiogenesi tumorale che, come già detto, consiste in un processo complesso

coinvolgente un vasta gamma di molecole effettrici e cellule stromali. VEGF, il più importante fattore coinvolto nel processo angiogenetico e fortemente attivo in molti tipi di neoplasie, ha la capacità di indurre una up-regolazione nella via di produzione da eNOS e la sovrapproduzione risultante di NO potrebbe associarsi all'alterazione della barriera endoteliale ed alla formazione di edema, inficiando la capacità delle terapie antiangiogenetiche di penetrare all'interno della formazione neoplastica [174]. eNOS, giocando a sua volta un ruolo essenziale nel mantenimento omeostatico della pressione sanguigna e nell'integrità vascolare per mezzo del rilascio costitutivo di NO, suggerisce come la disfunzione endoteliale sia uno dei fattori maggiormente coinvolti nella patogenesi dell'ipertensione cronica essenziale. Inibendo l'attività di VEGF è possibile ottenere la diminuzione dei livelli dell'intermedio vasoattivo ma anche la formazione di fenomeni di vasocostrizione ed ipossia non limitati però alla sola rete vascolare neoplastica; da ciò l'aumentata incidenza di uno dei maggiori effetti collaterali riscontrati nel trattamento con farmaci antiangiogenetici, come bevacizumab, ossia l'ipertensione arteriosa essenziale. Nello studio condotto da Niu e coll. sono stati indagati vari polimorfismi di eNOS, fra cui 894G>T e -786C>T, in relazione allo sviluppo di ipertensione in soggetti appartenenti a ceti razziali differenti i cui risultati hanno evidenziato una stretta associazione del primo polimorfismo con un aumento del 16% dell'incidenza di alterazioni pressorie (95% CI:1.07-1.27;p=0.001) mentre, per i soggetti con variante allelica -789C, tale effetto collaterale è stato riscontrato soprattutto nella popolazione di razza caucasica (HR=1.25; 95% CI:1.06-1.44; p=0.007) [175].

La soppressione dell'asse VEGF/eNOS attuata dagli agenti antiangiogenetici potrebbe comportare una diminuzione della pressione interstiziale e consentire una loro migliore distribuzione a livello della formazione neoplastica ma il trattamento con tali farmaci comporta, come frequente ripercussione sul profilo della tossicità, l'ipertensione arteriosa essenziale. Ad oggi non è stato ancora identificato il meccanismo attraverso il quale gli inibitori di VEGF inducano ipertensione. In diversi studi è stato osservato che VEGFR-2 provocherebbe l'attivazione di PI3K e quindi della protein-chinasi Akt e di eNOS, portando ad un aumento del vasodilatatore da essa prodotto. Pertanto è stato ipotizzato che, inibendo VEGF-A, si riduca la biodisponibilità di NO, con conseguente alterazione del rapporto fra quest'ultimo e il vasocostrittore endotelina-1 (ET-1), inducendo aumento della pressione diastolica [176, 177]. In base ai risultati emersi dallo studio di Niu e coll. ed in considerazione dell'alta incidenza di ipertensione arteriosa essenziale nei soggetti

sottoposti a terapia antiangiogenetica, è nata la necessità di indagare se l'insorgenza di tale effetto collaterale possa essere ricondotta al meccanismo d'azione sulla componente endoteliale di eNOS, utilizzando in tal senso i maggiori polimorfismi dell'enzima coinvolti con l'incidenza di ipertensione. In uno studio retrospettivo condotto da Eechoute e coll., sono stati studiati, in 255 pazienti affetti da cancro del rene a cellule chiare metastatico, i sette SNPs maggiormente coinvolti nei meccanismi di regolazione della pressione arteriosa a seguito del trattamento con sunitinib. In particolare sono stati analizzati i polimorfismi nei quattro geni di VEGF-A, di ET-1 e di eNOS, valutando i gradi di ipertensione associata e le variazioni della pressione sistolica (SBP), della pressione diastolica (DBP) e della pressione media arteriosa (MAP). Dall'analisi univariata è risultato predittivo dell'aumento della DBP l'aplotipo ACG in VEGF-A rs 699947 (-2578A>C), rs 833061(-460C>T) e rs 2010963 (405C>G), correlati quindi ad un aumento dei valori pressori durante il primo ciclo di trattamento con tale farmaco($p=0.026$), mentre nessuna associazione significativa è risultata fra i polimorfismi esaminati e l'aumento della pressione diastolica. Inoltre, la presenza dell'aplotipo ACG in VEGF-A è stata ricondotta a variazioni della MAP ($p=0.053$), mentre particolare interesse risulta essere la correlazione del polimorfismo -786T>C di eNOS con l'incidenza di ipertensione arteriosa di grado 3($p=0.045$). In base ai dati ottenuti si può ipotizzare che i polimorfismi di VEGF-A ed eNOS esaminati, in modo indipendente, potrebbero avere valore predittivo nello sviluppo di ipertensione arteriosa essenziale di vario grado nel setting metastatico comprendete pazienti sottoposti a trattamento con sunitinib e quindi la loro identificazione potrebbe essere di notevole utilità nell'identificazione di un sottogruppo di soggetti per i quali la terapia può essere iniziata o regolata anticipatamente. Nei pazienti con mRCC è stato evidenziato che l'ipertensione-indotta è capace di conferire un beneficio nella sopravvivenza, con un prolungamento della sopravvivenza media globale di 7,2 mesi ($P=0.035$ e $P=0.026$ per aumenti di SBP e DBP, rispettivamente) e di 6,3 mesi nei pazienti con alto MAP ($P=0.037$). L'ipertensione di grado 3 costituirebbe quindi essere un fattore indipendente per la sopravvivenza generale nei pazienti con mRCC [178].

1.7 RAZIONALE

Sulla base di quanto detto finora, il nostro studio, condotto su una casistica di pazienti con tumore della mammella metastatico sottoposte a trattamento con paclitaxel e bevacizumab, ha retrospettivamente valutato il ruolo dei maggiori polimorfismi di eNOS, 894G>T e -786 C>T, come predittivi nel profilo di tossicità e sull'outcome clinico delle pazienti arruolate.

Il razionale di questo studio è stato estrapolato in considerazioni delle seguenti osservazioni:

- Evidenze in vivo ed in vitro mostrano come il processo di neoangiogenesi tumorale sia di fondamentale importanza nelle fasi di progressione e disseminazione neoplastica.
- Uno studio randomizzato di fase III ha dimostrato che l'aggiunta di bevacizumab, associato a paclitaxel, in un regime chemioterapico di prima linea nel trattamento di pazienti affette da cancro della mammella metastatico, comporti un maggiore beneficio in termini di PFS (PFS mediana 11.8 mesi vs 5.9 mesi; $p < 0.001$), nonché di ORR (36.9% vs 21.2%; $p > 0.001$) rispetto alla sola somministrazione del taxano; quest'associazione costituisce attualmente un'opzione terapeutica di prima linea nel setting metastatico nella casistica non esprimente HER2.
- Il processo di angiogenesi tumorale risulta essere estremamente complesso, basato sull'equilibrio fra i fattori promuoventi, in primis VEGF, e fattori inibenti; numerosi studi illustrano come i meccanismi di feedback indotti dalla terapia con bevacizumab non coinvolgano solo l'espressione di VEGF, ma, tramite un meccanismo di up-regulation, venga indotta la produzione di NO per opera dell'enzima eNOS, con conseguenti ripercussioni sulla regolazione della vasodilatazione endoteliale.
- In numerosi studi retrospettivi sono state descritte associazioni significative tra alcuni polimorfismi dei geni coinvolti nel processo di neoangiogenesi tumorale e l'efficacia di bevacizumab. Da qui è nata la necessità di ricercare la correlazione esistente fra uno dei principali effetti collaterali riscontrati nella terapia con i farmaci antiangiogenetici: l'ipertensione arteriosa essenziale, e due dei maggiori polimorfismi di eNOS, correlati anch'essi ad alterazione dei valori pressori. Nello studio retrospettivo condotto da Niu e coll. è emersa una stretta associazione fra i

polimorfismi di eNOS -786C>T e 894G>T con l'aumento di incidenza dell'ipertensione arteriosa essenziale. Ricollegando tali osservazioni al profilo di tossicità relativo ai farmaci antiangiogenetici, Eechoute e coll., hanno condotto uno studio retrospettivo nel quale è stata evidenziata l'associazione fra il polimorfismo di eNOS -786C>T con l'incidenza di ipertensione arteriosa di grado 3 in soggetti con diagnosi di cancro del rene a cellule chiare metastatico trattati con sunitinib.

- La differenza di tossicità farmaco-indotta, la scarsa risposta o la resistenza riscontrata in una percentuale di pazienti ha fatto emergere l'importanza di ricercare biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità che permettano di selezionare un sottogruppo di soggetti in grado di beneficiare maggiormente del trattamento con bevacizumab. Questo permetterebbe un utilizzo più razionale delle risorse, anche in termini di gestione degli effetti collaterali indotti dalla terapia, nonché un vantaggioso rapporto tra costo ed efficacia del trattamento, in considerazione anche di una visione temporale più longeva, nella quale il beneficio in termini di sopravvivenza non si limiterebbe al prolungamento della sola PFS ma potrebbe estendersi anche ad un miglioramento in termini di OS.

1.8 OBIETTIVI

Il presente studio si propone di identificare polimorfismi genetici dell'enzima eNOS, sulla base della sua correlazione con uno dei maggiori mediatori angiogenetici coinvolti nel processo di neovascolarizzazione neoplastica, correlati con la risposta al trattamento con bevacizumab in termini di efficacia e tossicità, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo di ipertensione arteriosa essenziale, in pazienti affette da carcinoma della mammella metastatico. La valutazione dei varianti alleliche esaminate, correlate a polimorfismi non ancora studiati per tale farmaco, è stata inoltre associata con l'outcome clinico di queste pazienti.

L'analisi è stata condotta su DNA estratto da cellule della serie bianca (ottenuto attraverso un prelievo di sangue).

L'utilizzo nella pratica clinica di questi markers, se confermati in seguito in modo prospettico, consentirebbe di poter scegliere un trattamento alternativo per i casi con positività a tali determinanti molecolari nell'ambito di questo setting di pazienti o quanto meno permetterebbe di iniziare o regolare un'adeguata terapia di correzione dei valori pressori in una tempistica maggiormente favorevole.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Pazienti e disegno dello studio

I pazienti coinvolti nello studio sono stati reclutati presso il reparto di Oncologia Medica Universitaria dell'ospedale S. Chiara di Pisa, previa adesione mediante consenso informato scritto all'interno di un protocollo di valutazione dei polimorfismi di eNOS approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione clinica dei Medicinali dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana. La partecipazione allo studio consisteva nella donazione di circa 3 ml di sangue impiegato per l'analisi del genotipo; il sangue intero è stato raccolto in un contenitore sterile tipo Vacutainer® contenente sodio EDTA e mantenuto a 4°C. Tutti i campioni ematici sono stati spediti alla U.O. Farmacologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (AOUP). In totale sono stati esaminati 65 pazienti con diagnosi istologica di carcinoma mammario HER2 negativo (con malattia misurabile o meno), sottoposte a trattamento chemioterapico contenente l'associazione di paclitaxel e bevacizumab (ai dosaggi rispettivamente di 90mq/mq ev al giorno 1,8,15 e 10mg/kg ai giorni 1 e 15 con cicli ripetuti ogni 28 giorni). Lo studio prevedeva l'esecuzione di un prelievo ematico alle pazienti in trattamento per le analisi farmacogenetiche che esprimevano il loro consenso al prelievo e alle analisi previste dallo studio. Non essendo reperibili in letteratura dati concernenti l'esatta correlazione tra polimorfismi dei geni obiettivo delle analisi farmacogenetiche dello studio ed efficacia/tollerabilità dei trattamenti con bevacizumab, non è stato possibile applicare l'analisi statistica per calcolare la numerosità del campione dei pazienti da arruolare. Pertanto il presente studio retrospettivo è da considerare uno studio pilota, con arruolamento previsto di 150 pazienti. La risposta al trattamento è stata valutata secondo i criteri RECIST v1.1 (Appendice I). Per le pazienti con malattia non misurabile la progressione di malattia si è basata sul giudizio del medico oncologo secondo criteri clinici soggettivi (deterioramento del PS, aumento dei markers tumorali o dei versamenti neoplastici). Gli eventi avversi sono stati valutati in accordo a National Cancer Institute Common Terminology Criteria (NCI-CTCAEv4.0) (Appendice 2)

2.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA di ciascun paziente è stato estratto da sangue impiegando il QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN); 200 µl di campione sono stati trasferiti in una provetta da 1,5 ml

contenente 20 µl di Proteasi QIAGEN e 200 µl di buffer di lisi AL. I campioni sono stati agitati su vortex per 15 secondi ed incubati per almeno 10 minuti a 56°C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente sono stati aggiunti 200 µl di etanolo assoluto, i campioni sono stati di nuovo agitati su vortex per 15 secondi e il lisato è stato trasferito nella provetta contenente la colonna QIAmp. Dopo aver centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm (6000 g), il filtrato è stato eliminato e sono stati aggiunti 500 µl del primo buffer di lavaggio AW1. I campioni sono stati nuovamente centrifugati a 8000 rpm per 1 minuto. Senza eliminare il filtrato sono stati aggiunti 500 µl del secondo buffer di lavaggio AW2 e le colonne sono state centrifugate per 3 minuti a 14000 rpm. Successivamente le colonne sono state trasferite su provette da 2 ml e sono state centrifugate a 14000 rpm (20000 g) per 1 minuto. Infine il campione è stato trasferito in provette da 1,5 ml e sono stati aggiunti 200 µl di buffer di eluizione AE. Le colonne sono state centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto e il DNA eluito è stato trasferito in una provetta sterile da 1,5 ml e quantificato allo spettrofotometro. La concentrazione del DNA nella soluzione ottenuta, espressa in ng/µl, è stata determinata attraverso la misurazione della densità ottica per mezzo di uno spettrofotometro Nanodrop 2000 alla lunghezza d'onda di 260 nm. La concentrazione di DNA è stata calcolata per mezzo della seguente formula: $\text{Concentrazione} = (A_{260\text{nm}} \times 50 \times 500) / 1000$ dove $A_{260\text{nm}}$ rappresenta il valore dell'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 260 nm, 50 il coefficiente di assorbimento del DNA a doppio filamento a 260 nm e 500 il fattore di diluizione della soluzione di DNA. È stata inoltre effettuata una stima di purezza del DNA estratto sulla base del rapporto tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm (lunghezza d'onda di assorbimento degli acidi nucleici) e quella alla lunghezza d'onda di 280 nm (lunghezza d'onda di assorbimento delle proteine). Il DNA veniva considerato puro quando tale rapporto era compreso tra 1,6 e 2,0. Il DNA è stato utilizzato per l'analisi dei polimorfismi del gene che codifica per eNOS.

2.3 Amplificazione PCR del DNA genomico

L'analisi dei polimorfismi del gene che codifica per l'enzima eNOS è stata effettuata sul DNA genomico proveniente da campioni ematici con la tecnica PCR e mediante sequenziamento. La tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. La PCR sintetizza un segmento di DNA a

doppio filamento a partire da un filamento a singola elica; il filamento mancante viene sintetizzato ad opera della DNA-polimerasi che utilizza desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP), i quali vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato. È necessario identificare con precisione le estremità della sequenza da amplificare per poter sintetizzare gli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse. Una piccola quantità della sequenza da amplificare deve essere disponibile per dare inizio alla reazione, non è necessario che sia in forma pura, ma può anche far parte di una miscela complessa. Il prodotto della reazione sarà una molecola di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligonucleotidi utilizzati. I primers per la reazione sono stati scelti nelle regioni introniche del gene di eNOS (fig.3), in modo da includere nell'amplificato le intere sequenze degli esoni che compongono eNOS. Le sequenze dei primers utilizzati sono le seguenti:

La lunghezza dei frammenti amplificati era di 300 bp. La reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 50 μ l. Il protocollo che è stato seguito è il seguente:

- DNA genomico (0,1 μ g) 5 μ l
- Acqua DNAsi/RNAsi free 29,75 μ l
- Tampone per Taq DNA polimerasi (10 \times) 10 μ l
- Desossinucleotidi trifosfati (dNTPs 10 mM) 4 μ l
- Primer senso (20 pmol/ μ l) 1 μ l
- Primer antisenso (20 pmol/ μ l) 1 μ l
- GoTaq pol 0,25 μ l

Sono stati aggiunti alla miscela di reazione 5 μ l di dimetil solfossido (DMSO) ed è stato eseguito il seguente protocollo:

- DNA genomico (0,2 μ g) 5 μ l

• Acqua DNAsi/RNAsi <i>free</i>	24,75 µl
• tampone per Taq DNA polimerasi (10 X)	10 µl
• Deossinucleotidi trifosfati (dNTPs 10 mM)	4 µl
• DMSO	5 µl
• <i>primer</i> senso (20 pmol/µl)	1 µl
• <i>primer</i> antisenso (20 pmol/µl)	1 µl
• GoTaq pol	0,25 µl

Per il polimorfismo -786T<C l'amplificazione è stata eseguita nelle condizioni di PCR *touch down* : denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti seguita da denaturazione a 95 °C per 30 secondi, annealing a 61 °C per 30 secondi, sintesi a 68 °C per 30 secondi per 10 cicli con un decremento della temperatura di 0,5°C ad ogni ciclo; 95°C per 30 secondi, 56°C per 30 secondi e 68°C per 30 secondi per 30 cicli, con estensione finale a 72 °C per 7 minuti. Per gli esoni 1 e 2, le condizioni di PCR sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti seguita da denaturazione a 95 °C per 30 secondi, annealing a 64 °C per 30 secondi, sintesi a 68 °C per 30 secondi per 35 cicli, con estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

Per la reazione è stato utilizzato un termociclatore GENE AMP PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems). Il prodotto di PCR è stato visualizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio al 3%.

2.4 Analisi dei polimorfismi con sequenziamento automatico

Il sequenziamento automatico si basa sul metodo enzimatico di Sanger. Questa tecnica si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideossitriphosphate, ddNTPs), molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, ma mancanti del gruppo ossidrilico sul carbonio 2' e 3' della molecola. I dideossinucleotidi, a causa della loro conformazione, non possono formare legami fosfodiesterici, impedendo che un altro nucleotide si leghi ad essi ed interrompendo quindi la reazione di sintesi in posizioni specifiche. Il materiale di partenza è un frammento di DNA amplificato tramite PCR. Per far avvenire la reazione

si utilizza l'enzima DNAPol del fago T7 caratterizzato da elevata processività e attività nucleasica $3' \rightarrow 5'$ e $5' \rightarrow 3'$ praticamente nulla e con bassa discriminazione tra ddNTPs e dNTPs; si utilizza un oligomero che viene usato come primer per permettere l'inizio della reazione di polimerizzazione della DNAPol. Dal momento che la DNAPol sintetizza nella direzione $5' \rightarrow 3'$, il primer dovrà avere un'estremità $3'$ -OH libera da cui inizierà la polimerizzazione. Nella miscela di reazione vengono aggiunti i quattro dNTPs naturali che consentono di sintetizzare il nuovo filamento di DNA. Nel corso della polimerizzazione i nucleotidi vengono aggiunti all'estremità $3'$ -OH del nucleotide precedentemente inserito. Insieme ai dNTPs naturali verranno aggiunti nella miscela di reazione anche i dideossinTPs (ddNTPs) ovvero i terminatori di catena. Questi, non presentando il gruppo OH sul C3' del ribosio, una volta inseriti nel filamento nascente di DNA bloccano la DNAPol e la reazione si arresterà in corrispondenza del ddNTP inserito. La concentrazione dei ddNTPs sarà inferiore ai dNTPs naturali in quanto la reazione deve essere parziale per permettere comunque un'elongazione del DNA sintetizzato. Il risultato sarà quello di avere una miscela di nucleotidi che terminano la sintesi del DNA in tutte le posizioni in cui sul template era presente una T, A, G o C. I ddNTPs sono marcati con 4 diversi fluorocromi che assorbono tutti alla stessa lunghezza d'onda (λ_1) in modo da permettere l'uso di un solo laser per l'eccitazione. I fluorocromi emettono la radiazione fluorescente a λ_2 distinguibili tra di loro con spettri di emissione non sovrapposti; questo permette di eseguire la marcatura di un singolo campione di DNA con le quattro basi contenute nella stessa miscela di reazione e distinguere i nucleotidi in base alle diverse emissioni. I frammenti di DNA risultanti vengono separati con elettroforesi capillare e le emissioni fluorescenti, risultanti dall'eccitazione dei fluorocromi legati ai ddNTPs, vengono trasformate in segnali leggibili per mezzo di algoritmi di rilevazione. Il tracciato elettroforetico risultante sarà costituito da una serie di picchi di fluorescenza parzialmente sovrapposti l'uno all'altro corrispondenti ciascuno ad un segnale che viene emesso da un singolo frammento di DNA. L'algoritmo di base-coding (rivelazione) è un algoritmo di analisi del segnale che consente di identificare con precisione i picchi, separarli e attribuire loro direttamente le basi.

È necessario purificare il DNA ottenuto dalla reazione di PCR per rimuovere elementi contaminanti come dNTPs liberi, primers, enzima Taq pol e sali delle soluzioni tampone prima della reazione di Cycle sequencing. Senza purificazione il sequenziamento verrebbe compromesso dal rumore di fondo, da picchi sovrapposti e dal segnale

generalmente debole e non leggibile. La purificazione del prodotto di PCR è stata eseguita mediante il “Purification Kit QIAGEN” utilizzando colonne Centricon-100, in cui sono stati aggiunti 20 µl di campione di PCR e 200 µl di buffer di lavaggio PB. Le colonne sono state centrifugate a 13000 rpm per 1 minuto ed il filtrato è stato eliminato. Successivamente sono stati aggiunti 750 µl di un secondo buffer di lavaggio PE ed il campione è stato nuovamente centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto. Il Dna purificato è stato successivamente sottoposto alle reazioni di Cycle sequencing, utilizzando il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1 di Applied Biosystems. I primers per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per l’amplificazione con PCR. La reazione di sintesi e marcatura è stata eseguita in un volume di 20 µl contenenti:

- Template di DNA da PCR (20 ng) 6 µl
- H₂O DNAsi/RNAsi free 5,8 µl
- Tampone BigDye Sequencing 3 µl
- Ready Reaction Premix 2 µl
- Primer F/R (20 pmol/µl) 3,2 µl

Le provette contenenti i campioni di DNA e le miscele di reazione sono state sottoposte al seguente ciclo termico (Figura 13) in un termociclatore GENE AMP PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems):

- Denaturazione iniziale a 96 °C per 1 minuto
- 25 cicli di denaturazione a 96 °C per 10 secondi
- Annealing a 53 °C per 6 secondi
- Sintesi a 60 °C per 2 minuti

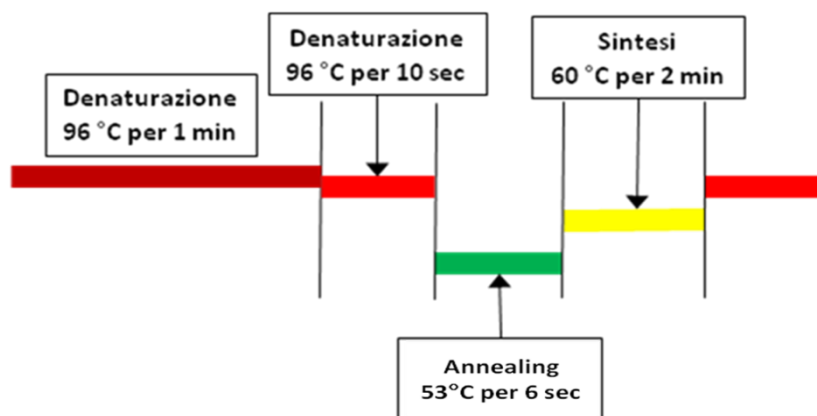


Figura 3- Schema del ciclo termico per amplificazione di eNOS

I campioni marcati sono stati nuovamente purificati con colonnine CentriSep contenenti un gel per eliminare sostanze contaminanti che possono interferire con la lettura in fluorescenza. Le colonne sono state preparate aggiungendo 800 μ l di acqua deionizzata, successivamente sono state agitate su vortex e poi lasciate a riposo per 30 minuti per permettere l'idratazione del gel. Deve essere posta particolare attenzione all'eliminazione completa di bolle d'aria nel gel. L'acqua in eccesso è stata completamente rimossa e la colonna è stata inserita nella provetta di lavaggio e posta in centrifuga a 730 \times g per 2 minuti per eliminare il liquido residuo. La colonna è stata, infine, rimossa dalla provetta di lavaggio e inserita in una nuova provetta da 1,5 ml per la raccolta del campione. Il campione è stato trasferito nella colonna di purificazione ed è stato centrifugato a 730 \times g per 2 minuti. A 10 μ l di campione purificato sono stati aggiunti 5 μ l di formammide per permettere la separazione del doppio filamento di DNA, i filamenti sono stati successivamente denaturati a 95°C per 2 minuti. Il prodotto della reazione è stato processato con ABI PRISM® 3100- Avant Genetic Analyzer dal quale è stato ottenuto l'elettroferogramma:

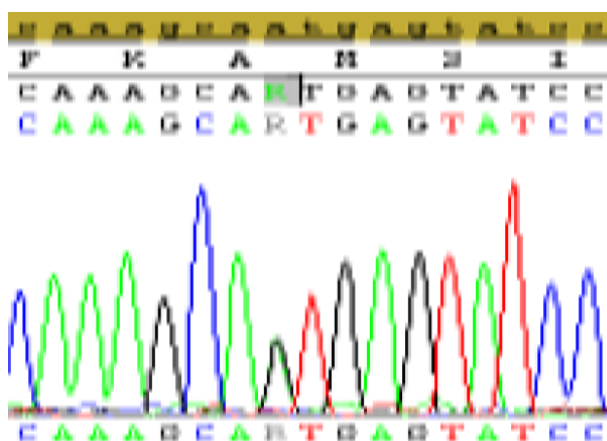


Figura 4- Tracciato grafico di sequenziamento automatico (elettroferogramma)

2.5 Real Time PCR – SNP genotyping

La valutazione dei polimorfismi dell'enzima eNOS è stata effettuata mediante un'analisi di PCR quantitativa, detta Real Time PCR (Fig.7), utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystem). Questa tecnica è una recente variante della PCR che permette di quantificare il DNA dopo ogni ciclo di amplificazione. In questo modo la Real Time PCR rende possibile seguire l'evolversi della reazione in tempo reale a differenza della PCR classica con la quale il risultato dell'amplificazione può essere verificato solo alla fine dell'esperimento. La tecnica della Real Time PCR prevede l'utilizzo di una sonda complementare al DNA da amplificare, la quale è marcata ad una estremità con un fluoroforo e all'estremità opposta porta un "quencher", una molecola che, quando è vicina al fluoroforo, è in grado di inibirne la fluorescenza. Il parametro misurato nella Real Time PCR è l'aumento di fluorescenza: all'inizio della reazione la sonda è ibridizzata al DNA stampo e la fluorescenza rilevata è nulla in quanto il quencher assorbe l'emissione del fluoroforo. Col procedere della reazione di amplificazione della sequenza stampo, la sonda viene gradualmente degradata nei suoi singoli nucleotidi ad opera dell'enzima AmpliTaq GoldR DNA polimerasi, che possiede attività esonucleasica 5'-3'. Questo determina il progressivo allontanamento del quencher, il quale non si troverà più sufficientemente vicino al fluoroforo per assorbirne l'emissione. Si osserverà dunque un aumento della fluorescenza, che sarà proporzionale alla quantità di DNA stampo contenuto nel campione. In questo caso sono state usate 2 sonde marcate con 2 diversi fluorofori (VIC e FAM), ciascuna specifica per uno dei due alleli dello SNP da analizzare. La reazione è stata eseguita su piastre da 96 pozzetti in un volume di 25 µl contenente:

1) TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
2) Assay	1,25 µl
3) DNA	20 ng (volume totale 11,25µl)

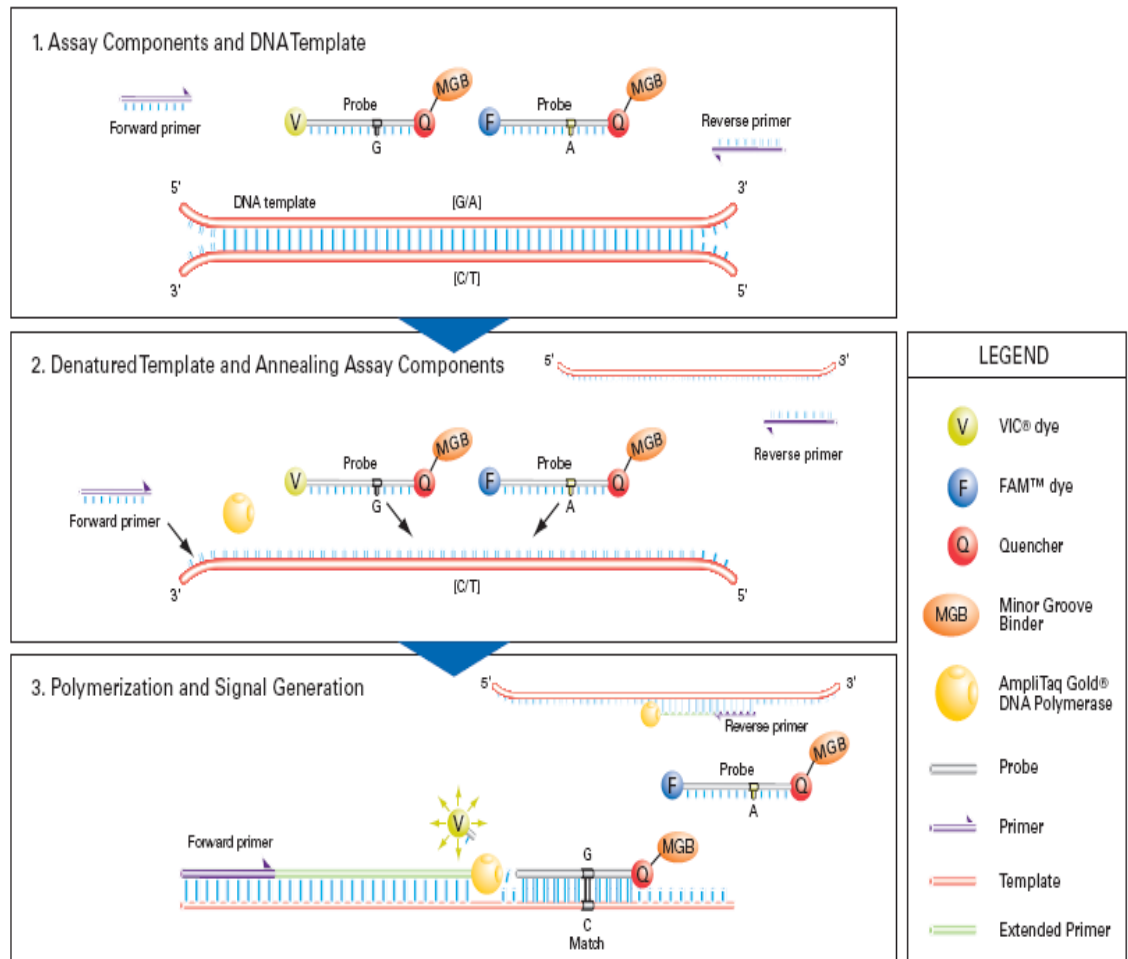


Figura 5- PCR REAL TIME

La piastra è stata inserita nello strumento ABI PRISM 7900HT nel quale i campioni sono sottoposti a 40 cicli di PCR con il seguente profilo termico:

- 1) fase di denaturazione a 95°C per 15 secondi;
- 2) annealing e sintesi a 60°C per 1 minuto

Al termine della PCR Real Time si ottiene un grafico che può assumere aspetti diversi:

- 1) se si osserva una sola curva il campione in esame è omozigote (Figure 6 e 8);
- 2) se si osservano 2 curve sovrapposte il campione in esame è eterozigote (Fig. 7).

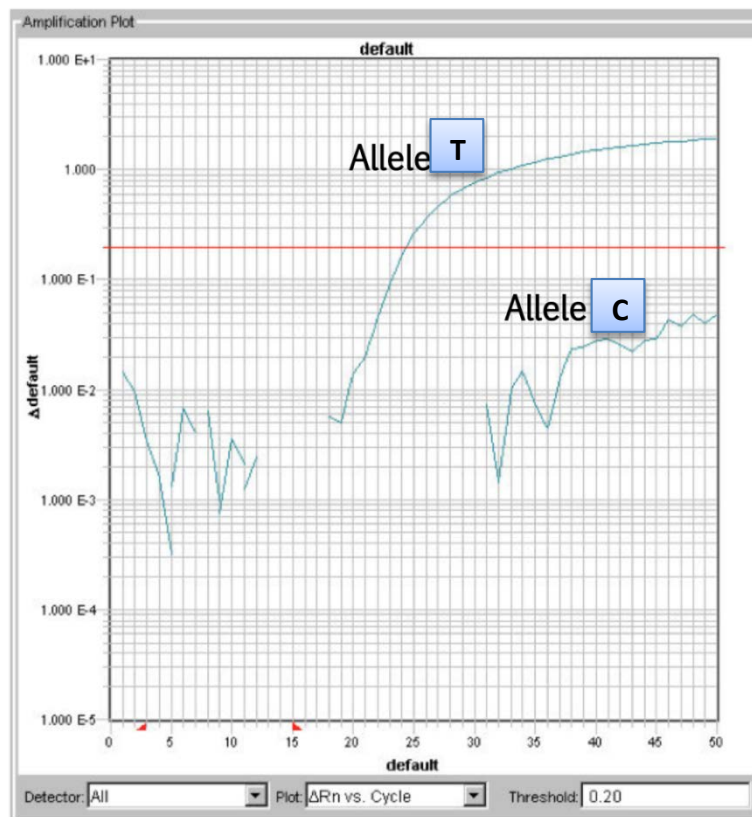


Figura 6. Genotipo omozigote eNOS -786TT

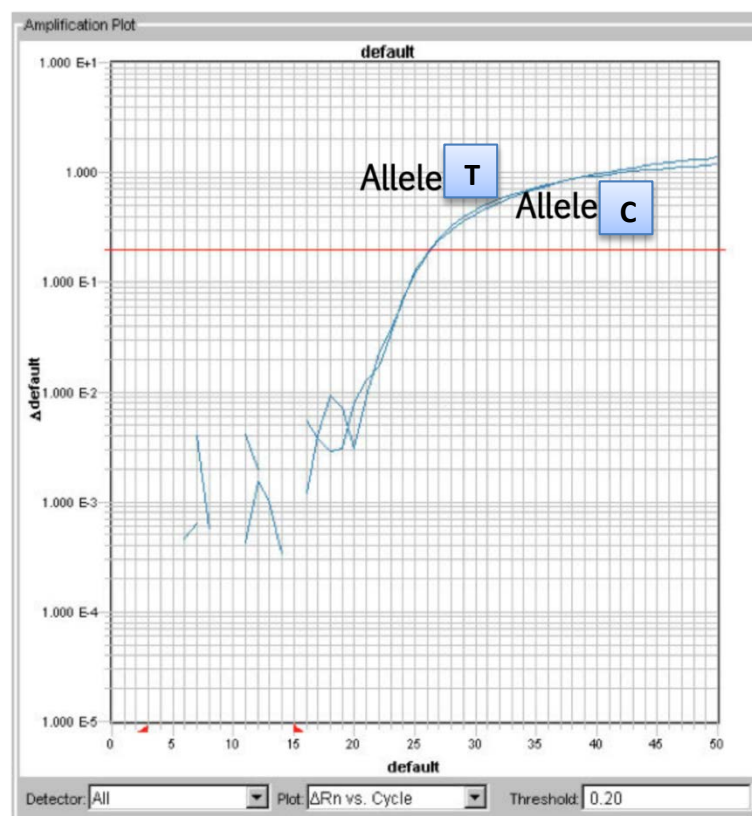


Figura 7. Genotipo eterozigote eNOS -786CT

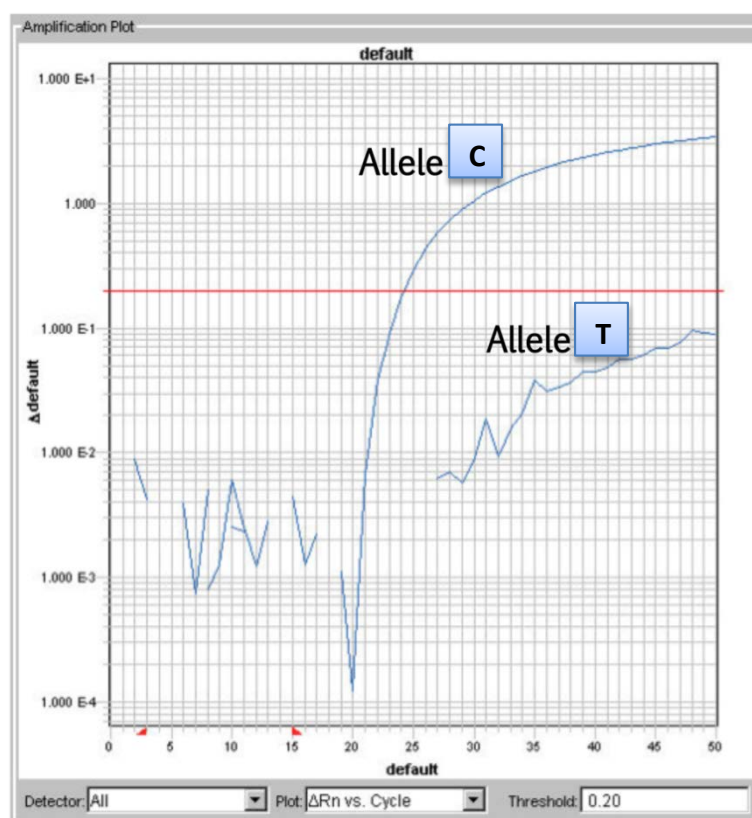


Figura 8. Genotipo omozigote eNOS -786CC

Tab.1 Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dei geni candidati allo studio				
Gene	Funzioni generali		SNP	Reference SNP
eNOS	Ossido nitrico	sintetasi	894 G/T	rs1799983
eNOS	Ossido nitrico	sintetasi	-786 C/T	rs2070744

5.6 Analisi statistiche

Obiettivi secondari sono la valutazione di potenziali associazioni tra i polimorfismi e il tasso di risposte (RR), definito dalla somma delle risposte parziali e complete di malattia (PR+CR), e tra i polimorfismi e la sopravvivenza globale (OS), definita come tempo dall'inizio del trattamento alla morte per ogni causa. Il metodo di Kaplan-Meier è stato

utilizzato per stimare l'impatto di ciascuna variabile clinica, patologica e genomica sul rischio di progressione o morte e il Log-rank test per analizzare eventuali differenze.

Data la natura esploratoria dello studio è stata assunta come significativa una $p < 0.05$. il metodo di Kaplan-Meier e il log-rank test per descrivere e confrontare le curve di PFS tra pazienti con profilo genetico favorevole rispetto alla restante popolazione di pazienti, e il modello e l'outcome

L'obiettivo primario di questa analisi retrospettiva è la valutazione di potenziali associazioni tra i polimorfismi di eNOS (Tab.1), gene implicato nella neoangiogenesi tumorale fissati in termini di associazione di tali variabili genetiche con l'eventuale alterazioni sul profilo di tossicità indotte da trattamento con bevacizumab, soprattutto per quanto riguarda l'incidenza di ipertensione arteriosa. Lo studio di è proposto inoltre di valutare, come obiettivi secondari, le potenziali associazioni fra i polimorfismi e la sopravvivenza libera da progressione (PFS), definita come tempo dall'inizio del trattamento alla progressione di malattia o morte per ogni causa nonché il tasso di risposte (RR), definito dalla somma delle risposte parziali e complete di malattia (PR+CR), e tra i polimorfismi e la sopravvivenza globale (OS), definita come tempo dall'inizio del trattamento alla morte per ogni causa.. Le curve del tempo alla progressione sono state disegnate secondo il metodo di Kaplan-Meier. I risultati sono stati espressi come hazard ratios (HR) e relativi intervalli di confidenza al 95% (95% CI). Sono state analizzate con il Log-Rank (Mantel Cox) test ed il Gehan-Breslow-Wilcoxon test per analizzare eventuali differenze. E' stata considerata significativa una $p \leq 0.05$.

3 RISULTATI

3.1 Caratteristiche delle pazienti

Sono state incluse 65 pazienti con diagnosi di carcinoma mammario metastatico sottoposte ad una trattamento chemioterapico di prima linea con paclitaxel e bevacizumab (ai dosaggi rispettivamente di 90mq/mq ev al giorno 1,8,15 e 10mg/kg ai giorni 1 e 15 con cicli ripetuti ogni 28 giorni).c/o la U.O. di Oncologia Medica di Pisa, dal Luglio 2009. La totalità delle pazienti era di sesso femminile, con età mediana di 59 anni (29-73) ed in buone condizioni generali, con ECOG Performance Status (PS) di 0 o 1 rispettivamente nel 94%(61/65) e 6%(4/65). Per quanto concerne le caratteristiche istopatologiche della neoplasia mammaria primitiva, nel 70% (45/65) presentava un carcinoma duttale infiltrante mentre nel 5% dei casi (3/65) era stato riscontrato un carcinoma lobulare infiltrante; la restante casistica riguardava istotipi meno frequenti come un caso di carcinoma mucinoso infiltrante. Il 100% dei casi aveva una patologia di tipo HER2 negativo (IHC 0/1+ in 56 casi oppure 2+/ FISH non amplificato, riscontrato in 9 pazienti). Nel 86% dei casi (56/65) il tumore primitivo esprimeva recettori estrogenici o progestinici, nel 11% dei casi (7/65) le pazienti risultavano ormononegative, mentre nei restanti 2 casi l'espressione dei recettori ormonali non risultava valutabile. La comorbidità per ipertensione arteriosa essenziale era presente nel 12% dei casi (8/65) e tutte le pazienti in questione erano sottoposte a terapia medica specifica mentre due pazienti avevano iniziato un trattamento con farmaci antipertensivi dopo l'inizio della somministrazione di bevacizumab. Solo una paziente presentava comorbidità cardiovascolare, nello specifico fibrillazione atriale, in trattamento medico con antiaritmico. Per quanto riguarda i trattamenti relativi al tumore primitivo, nel 79% dei casi (51/65) era stato eseguito un intervento chirurgico di trattamento locale della neoplasia, associato a chirurgia anche a livello ascellare mentre, per quanto concerne la terapia medica, nel 62% dei casi (40/65) è stata somministrata chemioterapia adiuvante di cui nel 18% (12/65) comprendeva taxani; sempre nel 62% dei casi (40/65) le pazienti erano state sottoposte a ormonoterapia adiuvante. Per quanto riguarda la fase metastatica l'età mediana al momento della diagnosi è risultata di 43 anni (range 34-74) ed in 9 pazienti la malattia aveva un quadro di esordio in stadio IV. I restanti casi avevano sviluppato malattia metastatica con un intervallo libero da malattia (DFI) mediano di 39 mesi (range 0 – 22 anni); il DFI risultava inferiore a 12 mesi nel 26% dei casi (17/65) e

superiore ai 12 mesi nel restante 74% dei casi (48/65). Per quanto riguarda l'estensione della malattia metastatica il numero mediano di sedi metastatiche risultava superiore o uguale a tre nel 60% delle pazienti (39/65) e inferiore a tre nel rimanente 40% dei casi (26/65), con un numero mediano di sedi metastatiche pari a 3 (range 1-7). Inoltre l'80% delle pazienti (52/65) presentava malattia viscerale, mentre in soli 3 casi la malattia era limitata all'apparato scheletrico. Per quanto concerne il trattamento di prima linea, le pazienti avevano ricevuto una chemioterapia con paclitaxel in associazione a bevacizumab per una durata mediana di circa 6 mesi (range 2-24+), in quanto al momento delle analisi, febbraio 2014, 10 pazienti sono ancora in corso di trattamento. Il 74% dei casi (48/65) ha ricevuto bevacizumab di mantenimento (10 mg/mq ev ogni 14 giorni o 15 mg/mq ev ogni 21 giorni) dopo il trattamento chemioterapico di prima linea, per una durata mediana di circa 8 mesi (range 1-29+), poiché attualmente 8 pazienti sono ancora sottoposte a tale terapia. In circa il 46% dei casi (30/65) è stata eseguita una seconda linea di trattamento, comprendente l'associazione con bevacizumab nel 11% delle pazienti (7/65). In generale la mediana delle linee di trattamento utilizzate nelle pazienti analizzate risulta corrispondere a 2 (range 1-5). Per quanto concerne gli altri trattamenti per la malattia metastatica, il 54% (35/65) dei pazienti ha ricevuto un trattamento ormonale. Le caratteristiche delle pazienti arruolate sopra descritte sono elencate nella tabella 2.

Tab.2 Caratteristiche delle pazienti (n=65)	N	%
ECOG(PS)		
0	61	94
1	4	6
2	0	0
Età mediana (range)	39 (29-73)	
HER2 (tumore primitivo)		
Negativo	65	100
Recettori ormonali (tumore primitivo)		
ER e/o PgR positivi	56	86
ER e PgR negativi	7	11
Sconosciuto	2	3

Comorbidità (ipertensione arteriosa essenziale)		
Si	8	12
No	57	88
Terapia medica specifica per HT		
Si	8	12
No	57	88
Comorbidità C/V		
Si	1	1
No	64	99
Terapia medica specifica per comorbidità C/V		
Si	1	1
No	64	99
Età mediana alla diagnosi di malattia MTS (range)	43(34-74)	
Precedente chemioterapia adiuvante		
No	13	20
Si	40	62
Si (Antraciline e Taxani)	12	18
Precedente ormonoterapia adiuvante		
No	25	38
Si	40	62
DFI Mediana [range](mesi)	39(0-264)	
< 12 mesi –n(%)	17	26
≥ 12 mesi –n(%)	48	74
Numero lesioni metastatiche- mediana (range)	3(1-7)	
≥ 3lesioni-n(%)	39	60
< 3lesioni-n(%)	26	40
Localizzazione di malattia		
Viscerale	52	80
Scheletro e/o tessuti molli	3	5
Bevacizumab di mantenimento		
Si	41	63
No	24	37

3.2 Efficacia e tossicità dell'associazione di bevacizumab e taxani

Nella tabella 2 sono riassunti i dati relativi ad efficacia e attività osservati nell'intera casistica di 65 pazienti con tumore mammario metastatico trattate con la combinazione di bevacizumab e taxani. Il tasso di risposte oggettiva corrisponde al 59%; dopo follow-up mediano di 35 mesi (95% CI 21-50), il 71 % delle pazienti (46/65) risulta progredito mentre sono stati registrati 31 decessi (48 %). Globalmente la PFS mediana risulta essere

di 14 mesi (95% CI 10-17) (Fig.9), mentre la sopravvivenza globale mediana è di 39 mesi (95% CI 28-48) (Fig.10). Le pazienti che hanno proseguito bevacizumab di mantenimento ammontano al 74% (48/65), la PFS mediana di questo gruppo corrisponde a 14 mesi (95% CI 13-16) rispetto ai 3 mesi (95% CI 3-16; $p < 0.001$ log-Rank)(Fig.11). . Nei pazienti che hanno proseguito terapia di mantenimento con l'anticorpo monoclonale è stata evidenziata anche una migliore OS mediana di 42 mesi (95% CI 36-48) rispetto ai pazienti non sottoposti a tale trattamento per i quali è stata registrata una OS mediana di 15 mesi (95% CI 12-18)(fig.12). Per quanto riguarda l'attività del trattamento, dei 65 casi in studio 4 pazienti (6.1%) hanno avuto una risposta completa di malattia (CR), 34 pazienti (52.3%) hanno avuto una risposta parziale (PR), 37 casi hanno evidenziato un tasso di risposte obiettive (ORR) pari al 58.6%, 23 pazienti (35.5%) hanno goduto di una stabilità di malattia (SD), mentre si è osservata una progressione di malattia (PD) in 4 pazienti(6.1%); (Tab. 3)

Tab.3 Attività ed efficacia del trattamento TXL+BV	N	%
CR	4	6.1
PR	34	52.3
SD	23	35.5
PD	4	6.1
ORR (CR + PR)	38	58.6

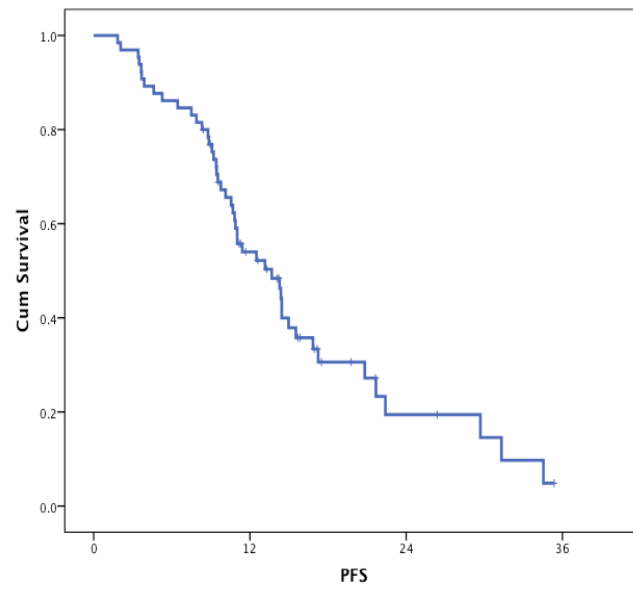


Figura 9 Median Progression Free Survival= 14 months (95%CI=10-17)

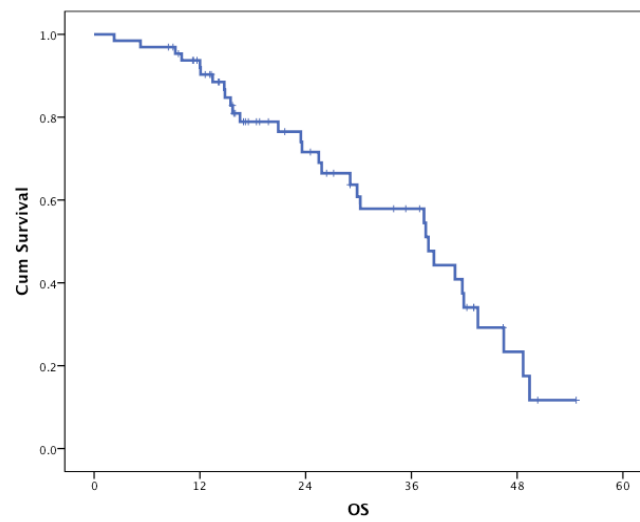


Figura 10 Median Overall Survival= 39 months (95%CI=28-48)

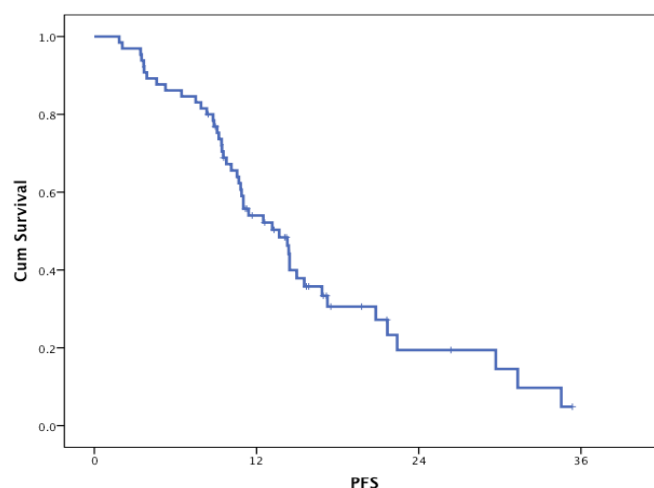


Figura 11 Median Progression Free Survival

Green-Bevacizumab maintenance = 14 months (95%CI=13-16)

Blue-No maintenance = 3 months (95%CI=0-16)

Log-Rank $p<0.00$

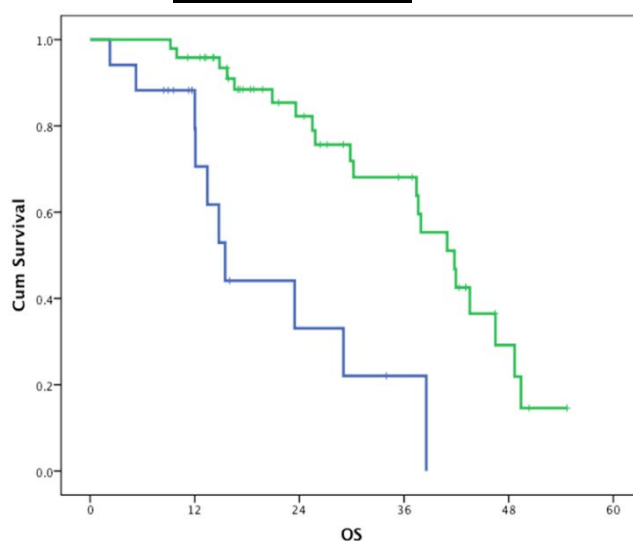


Figura 12 Median Overall Survival

Green-Bevacizumab maintenance = 42 months (95%CI=36- 48)

Blue-No maintenance = 15 months (95%CI=12-18)

Log-Rank $p<0.001$

Il trattamento con paclitaxel e bevacizumab è generalmente ben tollerato. Nella tabella 3 sono stati raccolti i risultati ottenuti in correlazione all'aumentata incidenza di effetti collaterali che, secondo la letteratura, sono maggiormente associati alle variabili genetiche di eNOS prese in esame in questo studio, durante il trattamento con inibitori di VEGF. In base ai risultati relativi al profilo di tossicità, è stata osservato lo sviluppo di ipertensione arteriosa globalmente in 46 pazienti (71%), di grado 1-3 (secondo NTC-CTCAE), mentre quelle che non avevano presentato tale effetto collaterale risultavano

essere circa il 25% (16/65) e, per le restanti 3 pazienti (5%), non è stato possibile valutare l'insorgenza di evento avverso. In particolare, considerando il massimo grado di tossicità per paziente valutato, riscontrato nel periodo di trattamento con bevacizumab, rispettivamente le pazienti con grado 1 ammontavano a 13 casi (20%), 28 pazienti (43%) hanno sviluppato il grado 2 e 5 pazienti il grado 3 (8%). In nessun caso era stato riscontrato il massimo grado di tossicità relativo allo sviluppo di ipertensione. La proteinuria è stata osservata in 33 pazienti (51%), a differenza dei restanti 32 casi (49%) risultati negativi. Nelle pazienti che avevano sviluppato proteinuria, i gradi di tossicità risultavano rispettivamente di grado 1/2/3 (secondo NCI-CTCAE) in 22 pazienti (34%), 7 pazienti (9%) ed infine 4 pazienti (6%). Anche in questo caso nessun paziente ha sviluppato il massimo grado di tossicità mentre per quanto riguarda l'epistassi è stata di entità lieve e non clinicamente significativa. In merito alle tossicità non direttamente correlate al bevacizumab globalmente il trattamento è stato ben tollerato, con eventi principalmente di grado lieve (grado 1 e 2 secondo NCI-CTCAE) di tipo gastrointestinali: nausea in 15 (23%) e 2 (3%) pazienti rispettivamente, diarrea in 8 (12%) e 1 (2%) rispettivamente, stomatite in 20 (31%) e 3 (5%) dei pazienti rispettivamente, astenia di grado 1 in 15 pazienti (23%), grado 2 in 14 pazienti (21%) ed infine neurotossicità di grado 1 in 17 pazienti (26%) e di grado 2 in 11 pazienti (17%). Gli eventi di grado 3, verificatisi raramente, sono relativi ad astenia in 2 pazienti (3%), neurotossicità in 1 paziente (2%). Non si sono verificati eventi tromboembolici di tipo venoso o arterioso (Tab.4).

Tab. 4 Massima tossicità per paziente nel periodo di trattamento con bevacizumab (n=65)				
TOSSICITA'	G1 n(%)	G2 n(%)	G3 n(%)	G4 n(%)
Ipertensione arteriosa essenziale	13 (20%)	28 (43%)	5 (8%)	-
Proteinuria	22 (34%)	7 (9%)	4 (6%)	-
Eventi tromboembolici arteriosi/venosi	-	-	-	-

Sanguinamenti	11(17%)	-	-	-
Nausea	15(23%)	2(3%)	-	-
Vomito	3(5%)	-	-	-
Mucosite	20(31%)	3(5%)	-	-
Diarrea	8(12%)	1(2%)	-	-
Astenia	15(23%)	14(21%)	2(3%)	-
Neurotossicità	17(26%)	11(17%)	1(2%)	-
Anoressia	12(18%)	5(8%)	-	-
Tossicità cutanea	15(23%)	2(3%)	-	-

3.3 Analisi delle varianti alleliche degli SNPs di eNOS

La valutazione dei polimorfismi del gene eNOS precedentemente citati è stata condotta sulla totalità della popolazione studiata (n=65) per quanto riguarda il polimorfismo 894G>T, e su 63 pazienti per l'altra variante allelica -786C>T. 27 pazienti (42%), risultavano wild-type con genotipo 894GG, mentre le restanti risultavano portatrici di mutazione allelica, il 54% (35 casi) rispettivamente con genotipo 894GT e il 5% (3 casi) con genotipo omozigote 894TT. Per quanto concerne il secondo polimorfismo invece i casi wild-type ammontavano a 24 (37%), quelli con genotipo -786TC risultavano essere il 34% (22), mentre le pazienti con genotipo -786TT rappresentavano il 26% (17 casi)(Tab.5).

SNP	Frequencies %	Frequencies %	Frequencies %
-786C>T	CC	CT	TT
	37%	33.8%	26.2%
894G>T	GG	GT	TT
	41.5%	53.8%	4.6%

Tab.5 Frequenze genotipiche

Per quanto concerne il polimorfismo 894G>T, la correlazione con l'outcome del sottogruppo con varianti alleliche GT/TT è risultata significativamente superiore rispetto alla restante popolazione con genotipo 894GG (rispettivamente p=0.0497 per il log-rank test e p=0.0142 per il Gehan-Breslow-Wilcoxon test), in quanto è stato evidenziata una

migliore PFS mediana (10.0 mesi vs 7.5 mesi; log-rank HR=1.61; CI 95%:1.1-3.1) per i genotipi eNOS 894GT e 894TT (Fig.13).

Viceversa, per quanto riguarda il secondo polimorfismo esaminato, -786C>T, i casi con varianti alleliche CT ed i wilde-type CC non hanno mostrato gli stessi benefici in termini di sopravvivenze rispetto agli omozigoti mutati TT (PFS mediana: 9.0 mesi vs 12.0mesi; log-rank HR=1.9;CI 95%: 1.4-3.9;rispettivamente p=0.0066 e p=0.0346 per il Gehan-Breslow-Wilcoxon test) (Fig.14).

In merito alla correlazione fra i due polimorfismi esaminati e le alterazioni sotto il profilo della tossicità, in particolare l'aumentata incidenza di ipertensione arteriosa, non è stata osservata un'associazione statisticamente significativa.

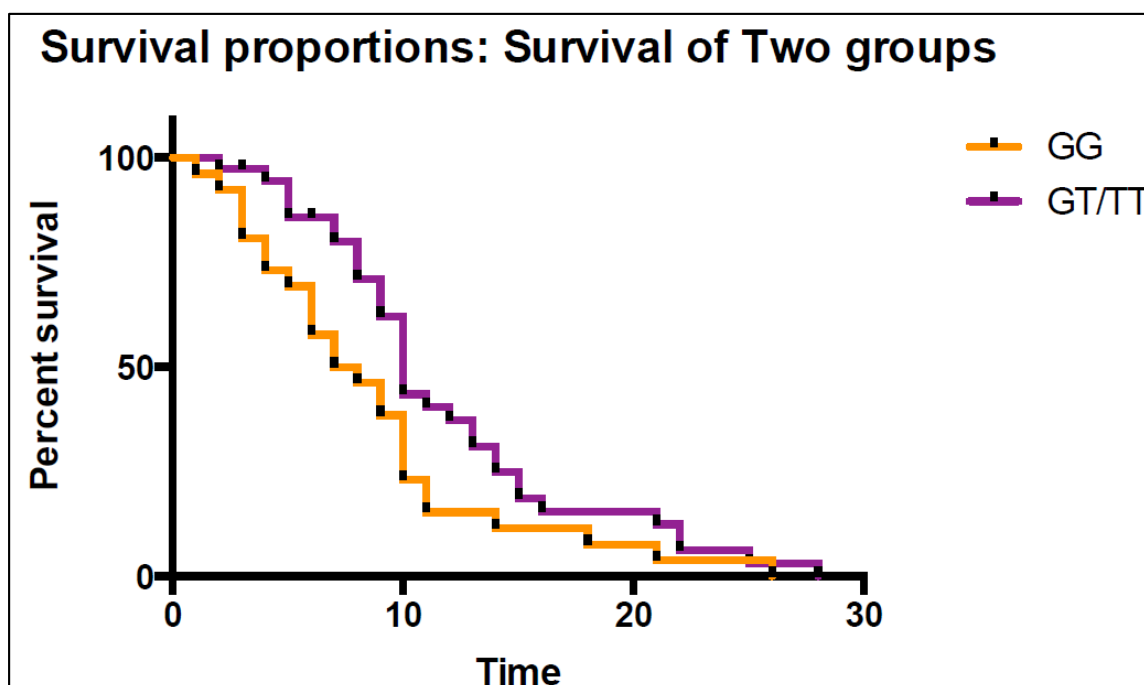


Figura13- Kaplan-Meier per PFS: eNOS 894GG vs eNOS 894GT/TT

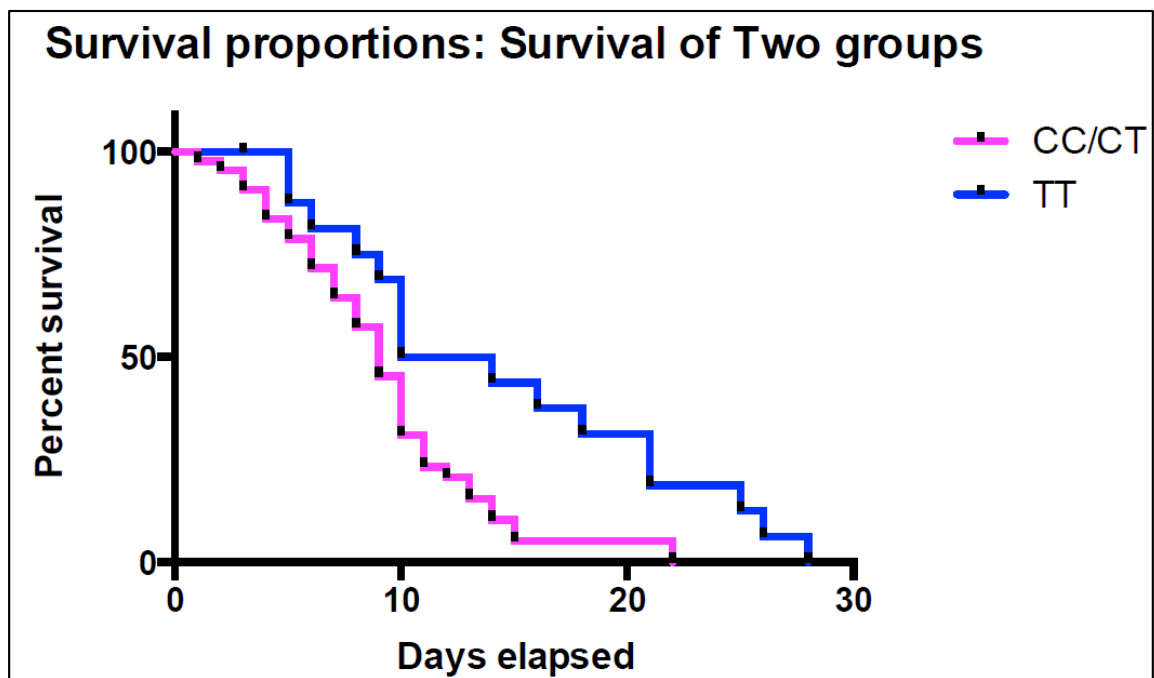


Figura 14-Kaplan-Meier per PFS: eNOS -786TT vs eNOS -786 CC/CT

4 DISCUSSIONE

In base ai risultati emersi dai numerosi studi clinici randomizzati di fase III [124][125][127], condotti per valutare l'efficacia sull'outcome clinico di un trattamento con bevacizumab in pazienti con carcinoma della mammella metastatico, è emerso che l'utilizzo di tale anticorpo monoclonale, diretto contro il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), in associazione ad una chemioterapia di prima linea, consente di ottenere un miglioramento della sopravvivenza libera da progressione e del tasso di risposte obbiettivo senza un peggioramento clinicamente evidente sul profilo della tossicità, affermandosi come opzione terapeutica di riferimento nel setting metastatico HER2 negativo. Nonostante ne sia noto il meccanismo d'azione la differenza di tossicità farmaco-indotta, la scarsa risposta o la resistenza riscontrata, in una percentuale di pazienti, hanno fatto emergere elementi di criticità a sfavore di questa strategia terapeutica sottolineando l'importanza di ricercare biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità che permettano di selezionare un sottogruppo di soggetti in grado di beneficiare maggiormente del trattamento con bevacizumab, nonché di utilizzare più razionalmente le risorse, anche in termini di gestione degli effetti collaterali. Attualmente, nonostante gli svariati studi preclinici e clinici condotti a riguardo, sia nel tumore della mammella che in altre neoplasie solide, non è possibile usufruire di marcatori predittivi di efficacia per tale farmaco. Si è reso quindi necessario valutare se l'incidenza di alterazioni sul profilo della tossicità, nonché la variabilità di risposta ad un trattamento il cui meccanismo d'azione si basa sull'inibizione del processo di neoangiogenesi, possa essere correlato ad una variabilità individuale geneticamente determinata dell'ospite tramite l'analisi di polimorfismi (SNPs) dei geni coinvolti nella formazione di nuovi vasi. Alcuni studi, analizzando i vari fattori coinvolti, hanno suggerito come, non solo VEGF, elemento chiave nel meccanismo neoangiogenetico, fortemente attivo in molti tipi di neoplasie, ma anche la sua azione di induzione, tramite up-regolazione, dell'enzima eNOS e la conseguente sovrapproduzione di NO, potrebbero associarsi alla variabilità individuale di risposta e tossicità al trattamento con agenti antiangiogenetici. Tale considerazione trova il suo fondamento nel ruolo di regolatore che eNOS ha sulla vasodilatazione endoteliale, in quanto la sua inibizione comporta vasocostrizione con successivo sviluppo di ipertensione arteriosa: uno dei maggiori effetti collaterali dei farmaci inibenti la neoangiogenesi tumorale. Queste considerazioni hanno fornito il

razionale per alcuni studi di valutazione dell'eventuale associazione di ipertensione arteriosa e di polimorfismi di eNOS implicati anch'essi nell'aumentata incidenza di alterazione dei valori pressori emodinamici [174-178]. Partendo da queste premesse, abbiamo condotto il primo studio retrospettivo nel tumore del seno basato sull'analisi di due polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dell'enzima eNOS atto ad identificarne il possibile ruolo predittivo in termini di tossicità ed efficacia di bevacizumab. Le analisi sono state condotte in relazione alle varianti alleliche eNOS 894G>T (collocato a livello dell'esone 7), ed eNOS -786C>C (localizzato a livello della regione 5'UTR), eseguite su una casistica di 65 pazienti con diagnosi di carcinoma della mammella metastatico, sottoposte a trattamento di prima linea con l'associazione di paclitaxel e bevacizumab ed eseguite su DNA estratto da sangue periferico. Nell'ambito degli eventi avversi registrati, quello riscontrato con maggiore frequenza, è stato rappresentato dallo sviluppo di ipertensione arteriosa globalmente in 46 pazienti (71%), di grado 1-3 (secondo NTC-CTCAE), rispettivamente 20% per il grado 1, 43% per il grado 2 ed 8% per il grado 3. La proteinuria è stata osservata nel 51% delle pazienti, rispettivamente di grado 1/2/3 (secondo NTC-CTCAE) : 34%, 9% e 6% dei casi. Per quanto riguarda le tossicità non direttamente correlate al bevacizumab, globalmente il trattamento è stato ben tollerato, con eventi di grado lieve (grado 1 e 2 secondo NCI-CTCAE) di tipo gastrointestinali come: nausea, diarrea e stomatite. Gli eventi di grado 3, raramente verificatisi, sono stati osservati relativamente ad astenia e neurotossicità. Il tasso di risposte oggettiva corrisponde al 59%; dopo follow-up mediano di 35 mesi (95% CI 21-50), il 71 % delle pazienti (46/65) risulta progredito mentre sono stati registrati 31 decessi (48 %). Globalmente la PFS mediana risulta essere di 14 mesi (95% CI 10-17), mentre la sopravvivenza globale mediana è di 39 mesi (95% CI 28-48). Le pazienti che hanno proseguito bevacizumab di mantenimento ammontano al 74% (48/65), la PFS mediana di questo gruppo corrisponde a 14 mesi (95% CI 13-16) rispetto ai 3 mesi (95% CI 3-16; $p<0.001$ log-Rank). Nei pazienti che hanno proseguito terapia di mantenimento con l'anticorpo monoclonale è stata evidenziata anche una migliore OS mediana di 42 mesi (95% CI 36-48) rispetto ai pazienti non sottoposti a tale trattamento per i quali la OS mediana corrispondeva a 15 mesi (95% CI 12-18). I risultati della nostra analisi risultano in linea con quanto già osservato in precedenti studi come l'E2100 nel quale l'impiego di bevacizumab in associazione a paclitaxel comportava un miglioramento della PFS mediana di 11.8 mesi rispetto ai 5.9 mesi dei soggetti che non avevano ricevuto

l'anticorpo monoclonale , in assenza di un vantaggio significativo in termini di OS e con il riscontro di una maggiore incidenza di eventi avversi , quali ad esempio l'ipertensione (13.5% vs 0%).[143] E' possibile quindi osservare come nella nostra casistica l'associazione di bevacizumab e paclitaxel abbia mostrato un miglioramento sull'outcome in linea anche con i dati emersi anche da altri studi randomizzati, come AVADO [125] e RIBOON-1[127]che indicano come tale trattamento di associazione impatti in modo significativo sulla PFS ed OS delle pazienti confermandosi come una ragionevole opzione per il trattamento di prima linea in pazienti con carcinoma mammario metastatico. Dai nostri dati si può ulteriormente osservare, che il trattamento di mantenimento con bevacizumab costituisca un'ulteriore rassicurazione sull'appropriatezza del proseguo dell'anticorpo monoclonale nelle pazienti non progredite al momento dell'interruzione della chemioterapia. I risultati ottenuti sono anch'essi in linea con quanto già riscontrato nello studio ATHENA, che suggeriva come il mantenimento fosse una strategia sicura in grado di assicurare un controllo di malattia a lungo termine, con valori di TTP mediano rispettivamente di 11.6 mesi e 6.7 mesi rispettivamente, e di OS mediana di 30 mesi e 18.4 mesi rispettivamente, nei pazienti che ricevevano un mantenimento con bevacizumab e in quelli in cui quest'ultimo veniva sospeso prima o al momento dell'interruzione della chemioterapia [126]. Per quanto concerne la correlazione dei polimorfismi di eNOS esaminati con l'outcome clinico delle pazienti, entrambi hanno evidenziato un beneficio in termini di PFS delle pazienti in studio. In particolare per quanto concerne il polimorfismo 894G>T, è stata evidenziata una PFS mediana più lunga (10.0 mesi vs 7.5 mesi; $p=0.0497$) per i genotipi eNOS 894GT e 894TT, rispetto alla popolazione wild-type. Mentre, per quanto riguarda il secondo polimorfismo esaminato, -786C>T, i casi con varianti alleliche CT ed i wild-type CC non hanno mostrato gli stessi benefici in termini di sopravvivenze, con PFS più brevi rispetto agli omozigoti mutati TT (9.0 mesi vs 12.0mesi; $p=0.0066$). In questo secondo caso l'impatto dei polimorfisimi sui benefici in termini di PFS è avvalorato, oltre al valore di significatività statistica, anche dalla maggiore frequenza di genotipi omozigoti mutati. E' possibile ipotizzare che i risultati ottenuti possano essere ricondotti al fatto che VEGF, inducendo eNOS, provochi normalmente alterazioni della barriera endoteliale ed edema con conseguente aumento della pressione interstiziale ed alterazione della drug delivery. La soppressione dell'asse VEGF/eNOS attuata dagli agenti antiangiogenetici potrebbe comportare, viceversa, una diminuzione di edema e della pressione interstiziale,

consentendo una migliore distribuzione del farmaco a livello della formazione neoplastica e comportando conseguentemente un possibile beneficio in termini di PFS nelle pazienti trattate. L'end-point primario dello studio non è stato raggiunto in quanto non è stata riscontrata un'associazione statisticamente significativa per quanto concerne la correlazione fra i due polimorfismi esaminati e le alterazioni sotto il profilo della tossicità, in particolar modo l'aumentata incidenza di ipertensione arteriosa. Questi risultati non sembrano in linea con quanto osservato nello studio, sebbene con una casistica più ampia, condotto Eechoute e coll., su 255 pazienti con diagnosi di cancro del rene a cellule chiare metastatico sottoposti a trattamento con sunitinib, nel quale i polimorfismi di eNOS esaminati anche nel nostro studio risultavano correlati ad una aumentata incidenza di ipertensione arteriosa di vario grado. In tale studio era stato osservato che, nei pazienti con ipertensione-indotta da trattamento, si verificava un prolungamento della sopravvivenza media globale di 7,2 mesi ($P=0.035$ e $P=0.026$ per aumenti di SBP e DBP, rispettivamente) e di 6,3 mesi nei pazienti con alto MAP ($P=0.037$) ipotizzandone quindi un possibile ruolo di tali polimorfismi come potenziali biomarcatori predittivi per la terapia antiangiogenetica [178]. Tuttavia l'esito dei risultati da noi ottenuti impone una doverosa interpretazione dei dati in quanto la natura delle rilevazioni pressori effettuate, è stata eseguita solo a livello ambulatoriale, senza l'integrazione dei valori con una misurazione, ad esempio, domiciliare e quotidiana della pressione arteriosa da parte delle pazienti stesse accompagnata dall'incidenza della comparsa di eventuale sintomatologia associata. La natura retrospettiva e l'assenza di un braccio di controllo, non permettono di trarre conclusioni definitive, pertanto i risultati sono comunque da intendersi come del tutto preliminari. Abbiamo infatti intenzione di ampliare la casistica delle pazienti da esaminare e di aggiungere altri due polimorfismi oltre a quelli già in studio. Se i risultati ottenuti fossero in seguito confermati in modo prospettico, consentirebbero di identificare in maniera più accurata i pazienti maggiormente responsivi ad un trattamento di prima linea con bevacizumab, permettendo un utilizzo più razionale delle risorse ed un approccio terapeutico personalizzato sul paziente.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
3. Forouzanfar, M.H., et al., *Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis*. Lancet, 2011. **378**(9801): p. 1461-84.
4. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
5. Gatta, G., et al., *Cancer prevalence estimates in Europe at the beginning of 2000*. Ann Oncol, 2013. **24**(6): p. 1660-6.
6. AIOM-AIRTUM, *I numeri del cancro in Italia 2013*. www.aiom.it.
7. Group, A.W., *Italian cancer figures--report 2006:1. Incidence, mortality and estimates*. Epidemiol. Prev, 2006 Jan-Feb. **30**(1 Suppl 2): p. 8-10,12-28,30-101 passim.
8. Evans, W.P., *Breast cancer screening: successes and challenges*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 5-9.
9. Mandelblatt, J.S., et al., *Modeling the impact of population screening on breast cancer mortality in the United States*. Breast, 2011. **20 Suppl 3**: p. S75-81.
10. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2011*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(6): p. 409-18.
11. Abdulrahman, G.O., Jr. and G.A. Rahman, *Epidemiology of breast cancer in europe and Africa*. J Cancer Epidemiol, 2012. **2012**: p. 915610.
12. Agboola, A.J., et al., *Molecular characteristics and prognostic features of breast cancer in Nigerian compared with UK women*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **135**(2): p. 555-69.
13. Justo, N., et al., *A review of breast cancer care and outcomes in Latin America*. Oncologist, 2013. **18**(3): p. 248-56.
14. Kotepui, M. and C. Chupeerach, *Age distribution of breast cancer from a Thailand population- based cancer registry*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(6): p. 3815-7.
15. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
16. Allemani, C., et al., *Breast cancer survival in the US and Europe: a CONCORD high-resolution study*. Int J Cancer, 2013. **132**(5): p. 1170-81.
17. Autier, P., et al., *Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database*. BMJ, 2010. **341**: p. c3620.
18. Giordano, L., et al., *Time trends of process and impact indicators in Italian breast screening programmes: 1998-2008*. Epidemiol Prev, 2010. **34**(5-6 Suppl 4): p. 27-34.

19. Giordano, L., et al., *[Process indicators and standards for the evaluation of breast cancer screening programmes]*. Epidemiol Prev, 2006. **30**(2 Suppl 1): p. 5-9, 11-47.
20. Giorgi, D., et al., *[Mammography breast cancer screening in Italy: 2010 survey]*. Epidemiol Prev, 2012. **36**(6 Suppl 1): p. 8-27.
21. He, C., et al., *Reproductive aging-associated common genetic variants and the risk of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(2): p. R54.
22. Kluttig, A. and A. Schmidt-Pokrzywniak, *Established and Suspected Risk Factors in Breast Cancer Aetiology*. Breast Care (Basel), 2009. **4**(2): p. 82-87.
23. Turati, F., et al., *Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case-control studies*. Ann Oncol, 2013. **24**(10): p. 2651-6.
24. Stratton, M.R. and R. Wooster, *Hereditary predisposition to breast cancer*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(1): p. 93-7.
25. Kuhl, C.K., et al., *Mammography, breast ultrasound, and magnetic resonance imaging for surveillance of women at high familial risk for breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8469-76.
26. Anderson, W.F., et al., *Male breast cancer: a population-based comparison with female breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(2): p. 232-9.
27. Villarini, A., et al., *Lifestyle and breast cancer recurrences: the DIANA-5 trial*. Tumori, 2012. **98**(1): p. 1-18.
28. Siegel, R., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(4): p. 220-41.
29. Saez, R.A., W.L. McGuire, and G.M. Clark, *Prognostic factors in breast cancer*. Semin Surg Oncol, 1989. **5**(2): p. 102-10.
30. Cianfrocca, M. and L.J. Goldstein, *Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer*. Oncologist, 2004. **9**(6): p. 606-16.
31. Korhonen, T., et al., *The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients*. Breast, 2013.
32. Thor, A.D., et al., *Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(2): p. 470-7.
33. Hammond, M.E., et al., *American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. J Oncol Pract, 2010. **6**(4): p. 195-7.
34. Dunbier, A.K., et al., *Relationship between plasma estradiol levels and estrogen-responsive gene expression in estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1161-7.
35. Hung, M.C. and Y.K. Lau, *Basic science of HER-2/neu: a review*. Semin Oncol, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 51-9.
36. Slattery, M.L., et al., *Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **140**(3): p. 587-601.
37. Bull, S.B., et al., *The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(1): p. 86-96.
38. Chia, S., et al., *Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5697-704.
39. Sari, E., et al., *Comparative study of the immunohistochemical detection of hormone receptor status and HER-2 expression in primary and paired recurrent/metastatic lesions of patients with breast cancer*. Med Oncol, 2011. **28**(1): p. 57-63.

40. Payne, R.C., et al., *Automated assay for HER-2/neu in serum*. Clin Chem, 2000. **46**(2): p. 175-82.
41. Segatto, O., et al., *Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(12): p. 5570-4.
42. Molina, M.A., et al., *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4744-9.
43. Christianson, T.A., et al., *NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5123-9.
44. Molina, M.A., et al., *NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(2): p. 347-53.
45. Saghatchian, M., et al., *Serum HER-2 extracellular domain: relationship with clinicobiological presentation and prognostic value before and after primary treatment in 701 breast cancer patients*. Int J Biol Markers, 2004. **19**(1): p. 14-22.
46. Hayes, D.F., et al., *Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(9): p. 2703-11.
47. Lipton, A., et al., *Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(6): p. 1467-72.
48. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-7.
49. Rosen, P.P., et al., *Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up*. J Clin Oncol, 1993. **11**(11): p. 2090-100.
50. Koscielny, S., et al., *Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination*. Br J Cancer, 1984. **49**(6): p. 709-15.
51. Fisher, B., et al., *Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update*. Cancer, 1983. **52**(9): p. 1551-7.
52. Bagaria, S.P., M.B. Faries, and D.L. Morton, *Sentinel node biopsy in melanoma: technical considerations of the procedure as performed at the John Wayne Cancer Institute*. J Surg Oncol, 2010. **101**(8): p. 669-76.
53. Norman, S.A., et al., *Lymphedema in breast cancer survivors: incidence, degree, time course, treatment, and symptoms*. J Clin Oncol, 2009. **27**(3): p. 390-7.
54. Giuliano, A.E., et al., *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer*. Ann Surg, 1994. **220**(3): p. 391-8; discussion 398-401.
55. Sandrucci, S., et al., *Sentinel lymph node mapping and biopsy for breast cancer: a review of the literature relative to 4791 procedures*. Tumori, 1999. **85**(6): p. 425-34.
56. Lin, K.M., et al., *Intradermal radioisotope is superior to peritumoral blue dye or radioisotope in identifying breast cancer sentinel nodes*. J Am Coll Surg, 2004. **199**(4): p. 561-6.
57. Martin, R.C., 2nd, et al., *Practical guidelines for optimal gamma probe detection of sentinel lymph nodes in breast cancer: results of a multi-institutional study. For the University of Louisville Breast Cancer Study Group*. Surgery, 2000. **128**(2): p. 139-44.
58. Jatoi, I., et al., *Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(8): p. 2334-40.
59. Weaver, D.L., *Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale*. Mod Pathol, 2010. **23 Suppl 2**: p. S26-32.

60. Cardoso, F., et al., *Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 7**: p. vii11-9.
61. Rosa Mendoza, E.S., E. Moreno, and P.B. Caguioa, *Predictors of early distant metastasis in women with breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(4): p. 645-52.
62. Kobayashi, T., et al., *Possible clinical cure of metastatic breast cancer: lessons from our 30-year experience with oligometastatic breast cancer patients and literature review*. Breast Cancer, 2012. **19**(3): p. 218-37.
63. Geiger, S., et al., *Long-term follow-up of patients with metastatic breast cancer: results of a retrospective, single-center analysis from 2000 to 2005*. Anticancer Drugs, 2011. **22**(9): p. 933-9.
64. Ahmad, A., *Pathways to breast cancer recurrence*. ISRN Oncol, 2013. **2013**: p. 290568.
65. Coleman, R.E., *Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 2): p. 6243s-6249s.
66. Greene, F.L., *The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging*. Bull Am Coll Surg, 2002. **87**(7): p. 13-5.
67. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
68. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
69. Woelfle, U., et al., *Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5679-84.
70. Boyle, P., *Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations*. Ann Oncol, 2012. **23 Suppl 6**: p. vi7-12.
71. Pal, S.K., B.H. Childs, and M. Pegram, *Triple negative breast cancer: unmet medical needs*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(3): p. 627-36.
72. Pogoda, K., et al., *Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients*. Med Oncol, 2013. **30**(1): p. 388.
73. Liedtke, C., et al., *The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(2): p. 591-9.
74. Harouaka, R., et al., *Circulating tumor cells: Advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 209-21.
75. Power, D.G. and N.E. Kemeny, *Nasal septum perforation and bevacizumab*. Med Oncol, 2011. **28**(1): p. 89-93.
76. Dong, X., K.R. Alpaugh, and M. Cristofanilli, *Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: a diagnostic tool for prognosis and molecular analysis*. Chin J Cancer Res, 2012. **24**(4): p. 388-98.
77. Fidler, I.J., *Selection of successive tumour lines for metastasis*. Nat New Biol, 1973. **242**(118): p. 148-9.
78. Ghossein, R.A. and S. Bhattacharya, *Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastases in prostatic, urothelial, and renal cell carcinomas*. Semin Surg Oncol, 2001. **20**(4): p. 304-11.
79. Cristofanilli, M., J. Reuben, and J. Uhr, *Circulating tumor cells in breast cancer: fiction or reality?* J Clin Oncol, 2008. **26**(21): p. 3656-7; author reply 3657-8.
80. Bernard-Marty, C., F. Cardoso, and M.J. Piccart, *Facts and controversies in systemic treatment of metastatic breast cancer*. Oncologist, 2004. **9**(6): p. 617-32.
81. Mouridsen, H., et al., *Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group*. J Clin Oncol, 2001. **19**(10): p. 2596-606.
82. Paridaens, R.J., et al., *Phase III study comparing exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal women: the European*

- Organisation for Research and Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(30): p. 4883-90.
83. Bonnetterre, J., et al., *Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(22): p. 3748-57.
 84. Nabholz, J.M., et al., *Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial*. *Arimidex Study Group*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(22): p. 3758-67.
 85. Osborne, C.K., et al., *Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(16): p. 3386-95.
 86. Howell, A., et al., *Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(16): p. 3396-403.
 87. Howell, A., et al., *Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma: a prospectively planned combined survival analysis of two multicenter trials*. *Cancer*, 2005. **104**(2): p. 236-9.
 88. Howell, A., et al., *Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(9): p. 1605-13.
 89. Robertson, J.F., et al., *Pharmacokinetic profile of intramuscular fulvestrant in advanced breast cancer*. *Clin Pharmacokinet*, 2004. **43**(8): p. 529-38.
 90. Chia, S., et al., *Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFECT*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(10): p. 1664-70.
 91. Robertson, J.F., et al., *Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(27): p. 4530-5.
 92. Di Leo, A., et al., *Results of the CONFIRM phase III trial comparing fulvestrant 250 mg with fulvestrant 500 mg in postmenopausal women with estrogen receptor-positive advanced breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(30): p. 4594-600.
 93. Baselga, J., et al., *Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(6): p. 520-9.
 94. Dhillon, S., *Everolimus in combination with exemestane: a review of its use in the treatment of patients with postmenopausal hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer*. *Drugs*, 2013. **73**(5): p. 475-85.
 95. Klijn, J.G., et al., *Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(2): p. 343-53.
 96. Crown, J., M. O'Leary, and W.S. Ooi, *Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience*. *Oncologist*, 2004. **9 Suppl 2**: p. 24-32.
 97. Chan, S., et al., *Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(8): p. 2341-54.
 98. Carrick, S., et al., *Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(2): p. CD003372.
 99. Sledge, G.W., et al., *Phase III trial of doxorubicin, paclitaxel, and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer: an intergroup trial (E1193)*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(4): p. 588-92.

100. Bria, E., et al., *Taxanes with anthracyclines as first-line chemotherapy for metastatic breast carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(4): p. 672-9.
101. Gherzi, D., N. Wilcken, and R.J. Simes, *A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer*. Br J Cancer, 2005. **93**(3): p. 293-301.
102. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Taxanes alone or in combination with anthracyclines as first-line therapy of patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 1980-6.
103. Albain, K.S., et al., *Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment*. J Clin Oncol, 2008. **26**(24): p. 3950-7.
104. O'Shaughnessy, J., *Capecitabine and docetaxel in advanced breast cancer: analyses of a phase III comparative trial*. Oncology (Williston Park), 2002. **16**(10 Suppl 12): p. 17-22.
105. Chan, S., et al., *Phase III study of gemcitabine plus docetaxel compared with capecitabine plus docetaxel for anthracycline-pretreated patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(11): p. 1753-60.
106. O'Shaughnessy, J.A., et al., *Capecitabine monotherapy: review of studies in first-line HER-2-negative metastatic breast cancer*. Oncologist, 2012. **17**(4): p. 476-84.
107. Cortes, J., et al., *Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study*. Lancet, 2011. **377**(9769): p. 914-23.
108. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
109. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
110. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
111. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(1): p. 4-6.
112. Ji, W.R., et al., *Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis*. FASEB J, 1998. **12**(15): p. 1731-8.
113. Rafii, S., et al., *Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 826-35.
114. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
115. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
116. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
117. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
118. Kim, K.J., et al., *The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies*. Growth Factors, 1992. **7**(1): p. 53-64.
119. Salven, P., et al., *Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1999. **53**(2): p. 161-6.
120. Gerber, H.P. and N. Ferrara, *Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies*. Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 671-80.
121. Cobleigh, M.A., et al., *A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 2003. **30**(5 Suppl 16): p. 117-24.

122. Miller, K.D., et al., *Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 792-9.
123. Relf, M., et al., *Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 963-9.
124. Miller, K., et al., *Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(26): p. 2666-76.
125. Miles, D.W., et al., *Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3239-47.
126. Smith, I., et al., *Final overall survival results and effect of prolonged (≥ 1 year) first-line bevacizumab-containing therapy for metastatic breast cancer in the ATHENA trial*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **130**(1): p. 133-43.
127. Robert, N.J., et al., *RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1252-60.
128. Brufsky, A.M., et al., *RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(32): p. 4286-93.
129. Ranpura, V., et al., *Increased risk of high-grade hypertension with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. Am J Hypertens, 2010. **23**(5): p. 460-8.
130. Chobanian, A.V., et al., *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. JAMA, 2003. **289**(19): p. 2560-72.
131. Nazer, B., B.D. Humphreys, and J. Moslehi, *Effects of novel angiogenesis inhibitors for the treatment of cancer on the cardiovascular system: focus on hypertension*. Circulation, 2011. **124**(15): p. 1687-91.
132. Keefe, D., et al., *Noncardiac vascular toxicities of vascular endothelial growth factor inhibitors in advanced cancer: a review*. Oncologist, 2011. **16**(4): p. 432-44.
133. Izzedine, H., et al., *Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients*. Ann Oncol, 2009. **20**(5): p. 807-15.
134. Maitland, M.L., et al., *Initial assessment, surveillance, and management of blood pressure in patients receiving vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibitors*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(9): p. 596-604.
135. Zhu, X., et al., *Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis*. Am J Kidney Dis, 2007. **49**(2): p. 186-93.
136. Eremina, V., et al., *VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1129-36.
137. Hapani, S., et al., *Increased risk of serious hemorrhage with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. Oncology, 2010. **79**(1-2): p. 27-38.
138. Johnson, D.H., et al., *Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(11): p. 2184-91.
139. Friedman, H.S., et al., *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4733-40.

140. Saif, M.W. and R. Mehra, *Incidence and management of bevacizumab-related toxicities in colorectal cancer*. Expert Opin Drug Saf, 2006. **5**(4): p. 553-66.
141. Leighl, N.B., et al., *Bleeding events in bevacizumab-treated cancer patients who received full-dose anticoagulation and remained on study*. Br J Cancer, 2011. **104**(3): p. 413-8.
142. Nalluri, S.R., et al., *Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. JAMA, 2008. **300**(19): p. 2277-85.
143. Scappaticci, F.A., et al., *Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(16): p. 1232-9.
144. Grothey, A., et al., *Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE)*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5326-34.
145. Scappaticci, F.A., et al., *Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab*. J Surg Oncol, 2005. **91**(3): p. 173-80.
146. Gruenberger, B., et al., *Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(11): p. 1830-5.
147. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2473-83.
148. Saif, M.W., A. Elfiky, and R.R. Salem, *Gastrointestinal perforation due to bevacizumab in colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(6): p. 1860-9.
149. Choueiri, T.K., et al., *Congestive heart failure risk in patients with breast cancer treated with bevacizumab*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 632-8.
150. Izumiya, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload*. Hypertension, 2006. **47**(5): p. 887-93.
151. Hawkes, E.A., et al., *Cardiotoxicity in patients treated with bevacizumab is potentially reversible*. J Clin Oncol, 2011. **29**(18): p. e560-2.
152. Ozcan, C., S.J. Wong, and P. Hari, *Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and bevacizumab*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 980-2; discussion 980-2.
153. Lambrechts, D., et al., *Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab*. J Clin Oncol, 2013. **31**(9): p. 1219-30.
154. Gasparini, G., et al., *Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy*. Cancer J Sci Am, 1999. **5**(2): p. 101-11.
155. Bidard, F.C., et al., *Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy*. Ann Oncol, 2010. **21**(9): p. 1765-71.
156. Jubb, A.M., et al., *Neuropilin-1 expression in cancer and development*. J Pathol, 2012. **226**(1): p. 50-60.
157. Loupakakis, F., et al., *Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 247.
158. Koutras, A.K., et al., *Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab*. Pharmacogenomics J, 2012. **12**(6): p. 468-75.
159. Loupakakis, F., et al., *Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2011. **104**(8): p. 1262-9.

160. Schultheis, A.M., et al., *Polymorphisms and clinical outcome in recurrent ovarian cancer treated with cyclophosphamide and bevacizumab*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7554-63.
161. Brostjan, C., et al., *Neoadjuvant treatment of colorectal cancer with bevacizumab: the perioperative angiogenic balance is sensitive to systemic thrombospondin-1 levels*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(7): p. 2065-74.
162. Schneider, B.P., et al., *Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100*. J Clin Oncol, 2008. **26**(28): p. 4672-8.
163. Michel, J.B., *[Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system]*. Pathol Biol (Paris), 1998. **46**(3): p. 181-9.
164. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
165. Knipp, S. and G. Bicker, *Regulation of enteric neuron migration by the gaseous messenger molecules CO and NO*. Development, 2009. **136**(1): p. 85-93.
166. Kleinbongard, P., S. Keymel, and M. Kelm, *New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood*. Thromb Haemost, 2007. **98**(5): p. 970-4.
167. Zago, A.S. and A. Zanesco, *Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise*. Arq Bras Cardiol, 2006. **87**(6): p. e264-70.
168. Cengel, A. and A. Sahinarslan, *Nitric oxide and cardiovascular system*. Anadolu Kardiyol Derg, 2006. **6**(4): p. 364-8.
169. Bellamy, T.C., et al., *Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2928-33.
170. Hingorani, A.D., et al., *A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK*. Circulation, 1999. **100**(14): p. 1515-20.
171. Ghilardi, G., et al., *Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene*. Clin Chem, 2002. **48**(7): p. 989-93.
172. Nagase, S., et al., *Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases*. Mol Cell Biochem, 2003. **244**(1-2): p. 113-8.
173. Nakagawa, T., et al., *Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 539-50.
174. Goel, S., et al., *Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 1071-121.
175. Niu, W. and Y. Qi, *An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24266.
176. Merkus, D., et al., *NO and prostanoids blunt endothelin-mediated coronary vasoconstrictor influence in exercising swine*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2075-81.
177. Wiley, K.E. and A.P. Davenport, *Physiological antagonism of endothelin-1 in human conductance and resistance coronary artery*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(4): p. 568-74.
178. Eechoute, K., et al., *Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) predict sunitinib-induced hypertension*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(4): p. 503-10.

6 APPENDICI

APPENDICE I Criteri RECIST per la valutazione della risposta (v 1.1)

R.response E.valuation C.criteri in S.olid T.umors (sintesi)

Elegibilità

• Negli studi dove l'obiettivo primario è la progressione tumorale, il protocollo deve specificare se l'arruolamento è ristretto ai pazienti con malattia misurabile (almeno una lesione misurabile) o se possono essere inseriti anche quelli con solo malattia non misurabile, alla valutazione basale (Recist 1.0 Solo pazienti con malattia misurabile al momento della valutazione basale dovrebbero essere inseriti in protocolli in cui l'obiettivo primario è la valutazione della risposta obiettiva del tumore).

_ **Malattia misurabile:** si ha quando è presente almeno una lesione misurabile. Se la malattia misurabile è ristretta ad una lesione solitaria, la sua natura neoplastica dovrebbe essere confermata con una indagine istologica/citologica.

_ **Lesioni misurabili:** lesioni misurabili in almeno una dimensione (registrare diametro maggiore), il cui diametro maggiore sia ≥ 20 mm se valutate con le metodiche radiologiche tradizionali o ≥ 10 mm se valutate con la TAC spirale o RMN.

_ **Lesioni non-misurabili:** sono tutte le lesioni che non rientrano nel criterio di definizione per le lesioni misurabili, lesioni scheletriche, lesioni meninge, ascite, versamento pleurico, versamento pericardico, carcinoma infiammatorio della mammella, linfangite carcinomatosa (cutanea o polmonare), masse addominali/organomegalia addominale identificata all'esame fisico che non è misurabile secondo metodiche riproducibili di imaging

- I linfonodi sono considerati normali se diametro minore < 10 mm, misurabili se diametro minore ≥ 15 mm e non misurabili se diametro minore compreso tra 10 e 15 mm (TC spirale)

- Possono essere considerate misurabili, lesioni scheletriche litiche con identificabile componente di tessuti molli, valutate alla TC o RMN, se la componente di tessuti molli rientra nei criteri di misurabilità sopra citati. (Lesioni osteoblastiche non sono misurabili)

- Lesioni cistiche semplici non dovrebbero essere considerate maligne. Lesioni "cistiche" complesse, radiologicamente indeterminabili, dovrebbero essere considerate lesioni non misurabili. Lesioni cistiche riferibili a metastasi possono essere considerate come lesioni misurabili, se rientrano nei criteri di misurabilità sopra citati. Comunque, se presenti nello stesso paziente lesioni non cistiche, è preferibile selezionare quest'ultime per la valutazione della risposta.

• La valutazione delle lesioni deve essere effettuata utilizzando regoli o calibri e le misurazioni devono essere riportate utilizzando il sistema metrico decimale.

- La valutazione basale delle dimensioni di una lesione deve essere fatta entro 4 settimane dall'inizio del trattamento chemioterapico.
- Le lesioni dovrebbero essere sempre valutate con la stessa metodica diagnostica durante tutto il trattamento.
- Le lesioni apprezzabili all'esame clinico sono considerate misurabili solo se superficiali (ad es. noduli cutanei e linfonodi palpabili). In caso di lesioni cutanee si raccomanda di allegare documentazione fotografica con scala metrica che permetta una stima del diametro della lesione.

Metodi di Misurazione

- TC e RMN sono attualmente le migliori metodiche disponibili e riproducibili per misurare le lesioni target selezionate per la valutazione della risposta. TC convenzionale e RMN dovrebbero essere effettuate con scansioni contigue < 10 mm. La TC spirale dovrebbe essere eseguita utilizzando un algoritmo di ricostruzione contigua a 5 mm. Queste indicazioni si applicano a tumori del torace, dell'addome e della pelvi. I tumori del distretto testa/collo e quelli delle estremità richiedono di solito specifici protocolli.
- Le lesioni valutate con Rx torace sono accettabili come lesioni misurabili quando sono chiaramente definite e circondate da parenchima polmonare aerato. Comunque la TC è preferibile.
- Quando l'endpoint primario dello studio è la valutazione della risposta obiettiva, l'ecografia non dovrebbe essere utilizzata per misurare le lesioni tumorali. Può comunque essere una possibile alternativa alle misurazioni cliniche di linfonodi palpabili e superficiali, lesioni sottocutanee e noduli tiroidei. L'ecografia può essere utile per confermare la scomparsa completa di lesioni superficiali valutate solitamente con l'esame clinico.

L'utilizzo di endoscopia e laparoscopia per la valutazione obiettiva di lesioni tumorali non è stata ancora convalidata pienamente ed estesamente. I loro usi in questo specifico contesto richiedono attrezzatura sofisticata ed un livello alto di esperienza che può essere solamente disponibile in alcuni centri. Perciò, l'utilizzo di tali tecniche per la valutazione obiettiva della risposta tumorale dovrebbe essere ristretta a scopi di conferma in centri specializzati.

Comunque, tali tecniche possono essere utili per confermare una risposta completa patologica con biopsie.

I marcatori tumorali non possono essere usati da soli per valutare la risposta. Se i marcatori sono inizialmente superiori al limite di normalità devono normalizzare perché un paziente possa essere considerato in risposta clinica completa quando tutte le lesioni siano scomparse.

La valutazione citologica ed istologica in alcuni casi possono essere usate per distinguere una RP da una RC.

Valutazione Basale: lesioni Target e non Target

Tutte le lesioni misurabili fino ad un totale di 5 (2 per ogni organo), rappresentative di tutti gli organi interessati dalla malattia, vengono identificate come lesioni “*target*” e quindi registrate e misurate nel corso della valutazione basale.

Le lesioni “*target*” devono essere selezionate in base alla dimensione del diametro maggiore (privilegiare le lesioni con diametro più lungo) e alla possibilità di poterle rivalutare nel corso del trattamento (con tecniche di immagine o clinicamente).

La somma dei diametri maggiori di *tutte le lesioni target* deve essere calcolata e registrata al momento della valutazione basale ed utilizzata in seguito come riferimento per la valutazione della risposta obiettiva del tumore.

- Tutte le altre lesioni (o sedi di malattia) dovrebbero essere definite come lesioni “non target” e possono essere registrate. La misurazione non è necessaria, ma la presenza o scomparsa può essere valutata nel corso del follow up. È possibile registrare un coinvolgimento di multiple lesioni non target in un organo come unica entità (es. “multiple linfadenopatie addominali” o “multiple lesioni epatiche”)

Valutazione delle lesioni Target

Risposta Completa (RC) si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “*target*”. Qualsiasi linfonodo patologico deve arrivare ad un diametro minore
< 10 mm.

Risposta Parziale (RP) si osserva una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “*target*” prendendo come riferimento la somma dei diametri maggiori calcolata al momento della valutazione basale

Progressione (PD) si osserva un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “*target*”, prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori (SLD) osservata dall’inizio del trattamento, e un aumento assoluto di almeno

5 mm nella SLD; oppure si osserva la comparsa di una o più nuove lesioni

Stabilità (SD) non si osserva né una diminuzione del 30% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “*target*” né un aumento del 20% della somma dei diametri maggiori delle lesioni “*target*”

Valutazione delle lesioni Non-Target

Risposta Completa (RC) si osserva la scomparsa di tutte le lesioni “*non target*” e la normalizzazione dei livelli sierici dei markers tumorali. Tutti i linfonodi devono avere dimensioni normali (diametro minore <10 mm)

Non RC- Non PD rimangono una o più lesioni “*non target*” e/o i livelli sierici dei markers tumorali restano sopra i valori normali

Progressione (PD) si osservano una o più nuove lesioni e/o un inequivocabile progressione delle pre-esistenti lesioni “*non target*”

Tutte le lesioni target registrate al basale devono essere registrate nelle successive valutazioni, anche se molto piccolo. Per lesioni target che diventano non misurabili con precisione dal radiologo, si assume un valore default di 5 mm.

Valutazione della migliore risposta globale

La migliore risposta globale è la migliore risposta osservata dall'inizio del trattamento fino a quando non si ha progressione o ripresa della malattia (prendendo come riferimento la somma più piccola dei diametri maggiori osservata dall'inizio del trattamento).

Lesioni target Lesioni non target Nuove lesioni Risposta globale

Lesioni target	Lesioni non target	Nuove lesioni	Risposta globale
RC	RC	NO	RC
RC	SD	NO	RP
RP	Non PD o NE (not evaluable)	NO	RP
RC	NE	NO	RP
SD	Non PD o NE	NO	SD
PD	Qualsiasi risposta	SI-NO	PD
Qualsiasi risposta	PD	SI-NO	PD
Qualsiasi risposta	Qualsiasi risposta	SI	PD

Per i soggetti senza malattia misurabile

<i>Non-target</i>	<i>New</i>	<i>Overall Response</i>
CR	No	CR
Non-CR / non-PD	No	Non-CR / non-PD
Not all evaluated	No	NE
Unequivocal	PD Yes or No	PD Any Yes PD

• I pazienti che a causa di peggioramento globale dello status di salute devono interrompere il trattamento senza che si osservi l'evidenza obiettiva di una progressione di malattia dovrebbero essere

classificati come pazienti con "deterioramento sintomatico" e dovrà essere fatto ogni sforzo per documentarne la progressione dopo la sospensione del trattamento

- In alcune circostanze può essere difficile distinguere la malattia residua dal tessuto sano.

Pertanto quando la valutazione della risposta completa dipende da questa determinazione si raccomanda di indagare la lesione residua con agoaspirato o biopsia per confermare la risposta completa.

Conferma

- L'obiettivo principale della conferma della risposta obiettiva è quello di evitare un sovrastima della percentuale di risposte osservate. Nel caso in cui non sia possibile confermare la risposta ciò deve essere chiaramente riportato nei risultati dello studio.
- La risposta parziale (PR) o completa (CR) devono essere confermate eseguendo una rivalutazione delle lesioni non prima di 4 settimane dopo la prima osservazione. Intervalli superiori, se previsti dal protocollo dello studio, possono essere ugualmente appropriati.
- Nel caso di SD questa deve essere confermata almeno in una successiva misurazione da eseguire dopo l'intervallo minimo previsto nel protocollo dello studio (generalmente, non inferiore a 6-8 settimane).

Durata della risposta globale

- La durata della risposta globale è misurata dal momento in cui i criteri di misurazione consentono di definire una RC o RP fino alla prima data in cui sia documentata obiettivamente ripresa di malattia o PD, prendendo come riferimento per la definizione della PD le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.

Durata della stabilità di malattia

- La SD è misurata dall'inizio del trattamento fino a quando i criteri di misurazione permettano di definire una PD prendendo come riferimento le più piccole misurazioni registrate dall'inizio del trattamento.
- L'importanza clinica della durata di una SD può essere diversa per differenti tipi di tumore. E' pertanto di fondamentale importanza che il protocollo specifichi il minimo intervallo di tempo richiesto tra due misurazioni per la determinazione di una SD. Questo intervallo di tempo dovrebbe prendere in considerazione l'aspettato beneficio clinico che tale status può portare alla popolazione in studio.

Revisione delle risposte

- Per studi in cui l'obiettivo primario sia la percentuale di risposte si raccomanda fortemente che tutte le risposte siano verificate e confermate da uno o più esperti indipendenti al momento del

completamento dello studio. La revisione simultanea delle cartelle dei pazienti ed delle immagini radiologiche è l'approccio migliore.

Presentazione dei risultati

- Tutti i pazienti inseriti nello studio devono essere valutati per la risposta al trattamento, anche se si siano verificate violazioni importanti del protocollo o se il paziente sia risultato ineleggibile.

Ciascun paziente sarà classificato in una delle categorie seguenti: 1) risposta completa, 2) risposta parziale, 3) malattia stabile, 4) progressione di malattia, 5) decesso precoce per la malattia maligna, 6) decesso precoce per tossicità, 7) decesso precoce per altre cause, o 9) sconosciuto (dati non valutabili, insufficienti).

- Tutti i pazienti che hanno soddisfatto i criteri di eleggibilità dovrebbero essere inclusi nell'analisi della percentuale di risposta. I pazienti la cui risposta rientri nelle categorie 4-9 dovrebbero essere considerati come non responsivi al trattamento (progressione di malattia).

Un errore nella scheda di trattamento o nella somministrazione di un farmaco non determina l'esclusione dalla valutazione della risposta. La definizione precisa delle categorie 4-9 deve essere specificata nel protocollo.

- Tutte le conclusioni dovrebbero essere basate sull'analisi di tutti i pazienti eleggibili.
- Le analisi su sottogruppi di pazienti possono essere effettuate escludendo i pazienti in cui si siano verificate importanti violazioni del protocollo (es., decesso precoce per altre cause, precoce interruzione del trattamento, significative deviazioni dal protocollo ecc.). Comunque, queste subanalisi non possono essere utilizzate come base per trarre conclusioni riguardo all'efficacia del trattamento, e le ragioni per cui i pazienti sono stati esclusi dall'analisi devono essere riportate chiaramente.
- Devono essere riportati gli intervalli di confidenza al 95%.

APPENDICE II National cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)

La severità degli eventi avversi è registrata second the Common Terminology Criteria for Adverse Event (CTCAE), versione 4.0 (28/05/2009)

<http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE>

RINGRAZIAMENTI

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al dott.re Andrea Fontana per avermi seguito nella realizzazione di questa tesi. Un ringraziamento speciale va alla dott.ssa Marzia Del Re per il suo prezioso aiuto. Un grazie particolare a tutti gli specializzandi della U.O di Medicina Oncologica di Pisa.

Ringrazio i miei genitori, mia sorella e Federico per il loro sostegno.